

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 1-NITROPYRENU
S VYUŽITÍM STŘÍBRNÉ TUHÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODY
V MINIATURIZOVANÉ DETEKČNÍ CELE

VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF 1-NITROPYRENE USING
SILVER SOLID AMALGAM ELECTRODE IN MINIATURIZED
DETECTION CELL

Diplomová práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Jindřich Karásek

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MŠMT ČR (projekt MSM0021620857 a projekt LC 06035).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Karoliny Peckové, Ph.D. a konzultanta Mgr. Vlastimila Vyskočila, a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 27. dubna 2010.

.....

podpis

Úvodem bych chtěl poděkovat své školitelce RNDr. Karolině Peckové, Ph.D. a konzultantu Mgr. Vlastimilu Vyskočilovi za odborné vedení. Dále bych chtěl poděkovat prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. a všem členům Katedry analytické chemie PŘF UK za všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

Předmětová hesla:

analytická chemie
elektrochemie
miniaturizované elektrody
nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky

Klíčová slova:

1-nitropyren
DC voltametrie
diferenční pulsní voltametrie
cyklická voltametrie
rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda

Abstract

Meniscus-modified silver solid amalgam electrode was used in miniaturized detection cell. It was constructed for determination of various analytes in decreased volume using 1-nitropyrene as a model analyte. Working electrode was placed together with reference ($\text{Ag/AgCl}/3 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KCl}$) and Pt wire auxiliary electrode in miniaturized voltammetric cell, using 120 μl of base electrolyte for measurements. The oxygen was removed from measured solutions by addition of saturated solution of sodium sulphite. Base electrolyte was composed of methanol and Britton – Robinson buffer pH12,0 in the ratio of 7:3. Determination was optimized for DC voltammetry and differential pulse voltammetry. Limits of quantitation were comparable of about $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ in both cases. The methods showed reproducible results with relative standard deviation $<3.65 \%$ ($n = 10$).

Abstrakt

Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda byla připravena pro použití ke stanovení v miniaturizované detekční cele s využitím referentní argentochlorodivé elektrody ($\text{Ag/AgCl}/3 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KCl}$) a pomocné Pt drátkové elektrody. Cella byla zkonstruována pro stanovení nejrozličnějších analytů v objemu vzorku cca 120 μl . V této studii byl 1-NP použit jako modelový analyt. Základní elektrolyt byl tvořen methanolem a BR pufrům o pH 12,0 v poměru 7:3. Odstranění kyslíku ze vzorku bylo provedeno přidávkou nasyceného roztoku siřičitanu sodného. Stanovení bylo optimalizováno pro metody DC voltametrie a diferenční pulsní voltametrie. Limity detekce byly shodné v obou případech, a to $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Metody vykázaly reprodukovatelné výsledky s chybou $<3.65 \%$ ($n = 10$).

Obsah

1. Úvod	9
1.1 Cíl práce.....	9
1.2 Miniaturizace	9
1.3 Vlastnosti zkoumané látky.....	12
1.4 Metody stanovení 1-nitropyrenu.....	14
1.5 Použitá pracovní elektroda.....	15
2. Experimentální část	17
2.1 Reagencie.....	17
2.2 Aparatura	17
2.3 Pracovní postupy	19
2.4 Stálost zásobního roztoku 1-nitropyrenu.....	21
3. Výsledky a diskuze.....	23
3.1. Konstrukce miniaturizované měřicí cely.....	23
3.2 Odstranění kyslíku	26
3.3 DC voltametrie 1-nitropyrenu	35
3.3.1 Vliv pH	35
3.3.2 Koncentrační závislosti.....	38
3.4 Diferenční pulsní voltametrie 1-nitropyrenu.....	42
3.4.1 Vliv pH	42
3.4.2 Koncentrační závislost.....	44
4. Závěr.....	49
Použitá literatura	50

Seznam použitých zkratk

1-NP	1-nitropyren
BR pufr	Brittonův - Robinsonův pufr
CAS	chemical abstract services
CAS RN	chemical abstract services registration number
CEEC	kapilární elektroforéza s elektrochemickou detekcí
CV	cyklická voltametrie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
DCV	direct current voltametrie, DC voltametrie
E_{in}	počáteční napětí potenciálového pulsu při regeneraci elektrodového povrchu
E_{fin}	konečné napětí potenciálového pulsu při regeneraci elektrodového povrchu
E_p	potenciál píku
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I_p	proud píku
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovení
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda
MS	hmotnostní spektroskopie
NPAU	nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
P_a	anodický pík
P_c	katodický pík
pH^f	směsné pH pufru po smíchání pufru a organické fáze v daném poměru
RSD	relativní směrodatná odchylka
UV	ultrafialová spektroskopie
α	hladina významnosti

1. Úvod

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) se vlivem znečištění životního prostředí, následkem průmyslových výrob a produkce spalin z tepelných elektráren a spalovacích motorů rozšířily téměř do všech oblastí světa. Stejně jako pesticidy a herbicidy, i PAU je možné prokázat v tucích polárních živočichů, dochází tedy k jejich distribuci v potravním řetězci^[1]. Dalším dokladem celosvětového rozšíření PAU je fakt, že po výbuchu elektrárny v Černobylu byla provedena analýza norských ledovců, kde byly kromě radioaktivního prachu prokázány i PAU a NPAU (TOXNET). Byla prokázána spojitost mezi profesionální expozicí^[2] a vznikem nádorových onemocnění. PAU jsou mutagenní až po předchozí metabolické aktivaci, nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAU) jsou mutagenní přímo^[1]. Mechanismus vzniku aktivních metabolitů byl podrobně studován^[3, 4].

1.1 Cíl práce

Cílem této práce je nalézt optimální podmínky pro stanovení stopových množství 1-nitropyrenu (1-NP), což je modelový analyt pro NPAU^[1], ve směsném pufrovaném prostředí methanolu (MeOH) a vody (objemový poměr 7:3) v menším objemu vzorku (řádově 100 μ l) s využitím miniaturizované rtuťovým meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrody (m-AgSAE). Dílčím cílem byla konstrukce cely vhodných rozměrů (kap. 3) Pro stanovení 1-NP bylo použito techniky DC voltametrie na m-AgSAE a diferenční pulsní voltametrie na m-AgSAE. Stanovení bylo provedeno v objemu 120 μ l a pro kontrolu i v objemu 12 ml. Pro charakterizaci elektrodových dějů probíhajících při elektrochemických přeměnách 1-NP na m-AgSAE byla použita cyklická voltametrie.

1.2 Miniaturizace

Pro využití elektrochemie v analytické chemii obecně hovoří hned několik výhod^[5-7]:

- 1) Technologie výroby součástí měřicího obvodu je dostatečně známá a zvládnutá.

- 2) Odezva detektoru je ve formě snadno elektronicky vyhodnotitelné, čímž odpadá nutnost konverze signálu na elektrický signál, což je dalším zdrojem šumu.
- 3) Zařízení nebo jejich elektroaktivní části lze zpravidla miniaturizovat bez snížení odezvy na analyt (detekčního limitu).
- 4) Jejich výroba a provoz jsou relativně méně nákladné než u instrumentálních metod se srovnatelnými detekčními limity.
- 5) Měření je možné i v málo vodivém prostředí, protože proud procházející elektrodou je v řádu nA či pA, a tak je zanedbatelný vliv polarizace elektrod v důsledku odporu v elektrolytu.
- 6) Při použití vhodné instrumentace je další výhodou plynoucí z výše uvedených faktů především nízký šum a možnost rychlé změny potenciálu elektrody.

Nevýhody použití elektrochemie jsou srovnatelné s ostatními problémy v instrumentální analýze. Pro stanovení směsi analytů je nutné, aby měly dostatečně rozdílný redoxní potenciál a aby se tento potenciál nacházel v potenciálovém okně soustavy základní elektrolyt (ZE) elektroda. Přímou lze elektrochemicky stanovit řadu analytů, nicméně většinou tak nelze učinit přímo v matrici vzorku, je tedy nutné předřadit separační nebo extrakční krok. Stanovit lze všechny barevné organické látky – tento fakt je dán tím, že struktury odpovídající za barevnost molekuly bývají většinou i elektrochemicky aktivní, tedy oxidovatelné nebo redukovatelné.

Pokud je žádoucí stanovovat jeden analyt nebo předem definované analyty ve známých a dobře definovaných podmínkách, elektrochemické metody jsou vhodné jako časově i finančně poměrně nenáročná alternativa k jiným instrumentálním metodám^[7]. Toto platí zejména při rutinních analýzách v nejrůznějších chemických či farmaceutických provozech nebo pro klinickou praxi, jak je uvedeno níže.

Mikroelektroda je elektroda, jejíž charakteristický rozměr je za daných experimentálních podmínek menší, než je tloušťka difuzní vrstvy. Z praktických

důvodů se také mikroelektroda definuje jako elektroda, která má alespon jeden charakteristický rozměr menší než 100 μm

Mikroelektrody jsou vyráběny z nejrůznějších materiálů, nejčasteji z různých forem uhlíku (uhlíkové pasty a inkousty, uhlíková vlákna, a nebo soustavy uhlíkových mikroelektrod). Dále jako materiál výroby mikroelektrod slouží vácné kovy (zlato, stříbro, platina) či měď.

Mikroelektrody lze používat buďto jednotlivě, nebo v souboru elektrod^{[6],[5, 7]} (anglicky microelectrode arrays). Soubory mohou být uspořádané nebo náhodné^[6]. Tloušťka difuzní vrstvy při použití těchto souborů velmi záhy vzroste tak, že se celý soubor chová jako jediná elektroda, jejíž plocha je rovna součtu ploch celého souboru. Tento fakt je příčinou toho, že proud procházející mikroelektrodou je vždy větší, než by v daném čase odpovídalo planární elektrodě o stejně velké ploše a za podmínek lineární difuze^[8].

Vzhledem k rostoucímu zájmu o mobilní analytická zařízení, nacházejí mikroelektrody uplatnění v konstrukci detektorů těchto zařízení, třeba v kapilární elektroforéze v provedení na čipu s elektrochemickou detekcí^{[9] [10]}. Otázka odvedení vysokého napětí pro separaci není předmětem této práce a je dostatečně vysvětlena jinde^[11-13]. Více jsou rozšířeny zejména pro tyto dvě metody – HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) a CEEC (kapilární elektroforéza s elektrochemickou detekcí) v provedení na čipu^[11]. Na tomto čipu probíhá separační krok a zároveň je zde umístěna detekční oblast.

Obecně se nejčastěji používají mikroelektrody na bázi vzácných kovů: zlato, platina, stříbro a dále na bázi uhlíku, ať už ve formě tuhé, nebo pastové, případně tištěné^[11, 13]. U elektrody tvořené vzácným kovem může docházet k pasivaci, což vede ke snižování signálu. Uhlíkové elektrody mají v tomto ohledu širší využití, avšak u nich má pro změnu na funkčnost větší vliv tzv. historie elektrody^[8].

Mikroelektrody se dají použít ke sledování aktivity transportních proteinů na biologických membránách, ke stanovení glykemie a dalších klinických parametrů v krvi^[8, 14, 15].

Dalším příkladem je mikrocyklindrická elektroda z platiny či mědi pro detekci v HPLC stanovení aminokyselin^[11]. Je to významný přínos pro možnost přímého stanovení aminokyselin s limity detekce LOD (limit of detection, limit detekce)= $1,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ (histidin) – $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ (tryptofan) . Touto metodou je možné stanovit i katecholaminy^[13], což jsou významné hormony a tento fakt otevírá možnosti využití v patologické praxi.

Miniaturizované detekční cely zažívají v poslední době nárůst zájmu a jsou předmětem mnohačetných výzkumů^[10-13, 16].

Výhodou měření v menším objemu je menší spotřeba vzorku, stanovení je celkově ekonomičtější i ekologičtější. Je tak možné využít elektrochemické metody i tam, kde se pracuje s menšími objemy, například v klinické praxi pro stanovení metabolitů cytostatik^[6], virostatik a markerů některých otrav.

V této práci je proveden experiment s použitím m-AgSAE připravené z vhodného typu pipetové špičky s prodlouženou koncovou částí s cílem umožnit použití tohoto typu elektrody v prostorově omezeném prostředí, či pro umožnění měření v objemu řádově 10-100 μl . m-AgSAE je vhodná pro stanovení redukovatelných analytů, jelikož má široké potenciálové okno, nízký šum a snadno obnovitelný povrch umožňující eliminovat vliv historie elektrody^[17].

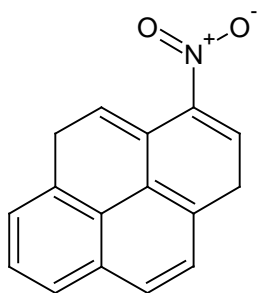
1.3 Vlastnosti zkoumané látky

Název CAS: 1-NITROPYRENE

CASRN: 5522-43-0

Sumární vzorec: $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{NO}_2$

Strukturní vzorec:



1-NP tvoří žluté jehlovité krystalky. Jeho molární hmotnost je $247,26 \text{ g.mol}^{-1}$. Bod tání je 155°C . Polarita 1-NP, vyjádřená poměrem koncentrací v prostředí oktanol/voda, je $\log K_{ow} = 5,06$. Rozpouští se v ethanolu, benzenu, methanolu, dobře rozpustný je v dimethyleteru. Rozpustnost ve vodě je $0,0118 \text{ mg.l}^{-1}$ při 25°C ^[18]. Při zahřívání 1-NP se uvolňují toxické páry oxidů dusíku. Vzhledem ke kontaktní toxicitě^[19] se doporučuje při manipulaci používat rukavice a masku s respirátorem.

1-NP je jedním z nejrozšířenějších NPAU. Ve vodě se 1-NP adsorbuje na suspendované pevné částice a sedimentuje, nepodléhá hydrolyze. V půdě se adsorbuje na částice jílu a téměř nemigruje^[1]. Bakteriální redukce nitroskupiny na aminoskupinu probíhá za aerobních i anaerobních podmínek^[19]. Spolu s 2-nitropyrenem a 4-nitropyrenem byl identifikován ve spalínách naftových motorů, v přepáleném oleji po přípravě jídel a při spalování uhlí. Metabolity 1-NP byly zkoumány jako markery profesionální expozice NPAU^[19]. Dále byl identifikován v grilovaném jídle v rozmezí koncentrací řádově jednotky až desítky $\mu\text{g.kg}^{-1}$. 1-NP lze prokázat ve tkáních rostlin rostoucích ve znečištěných lokalitách^[20].

Do těla vstupuje 1-NP přes plíce^[2], vstřebává se kůží a je přijímán v potravě a pitné vodě. Metabolizován je převážně v játrech enzymatickým systémem P450, a to jmenovitě cytochromem 3A4 rodiny, který zprostředkuje vznik dvou skupin metabolitů^[3] - hydroxynitropyrenů a aminopyrenů. Hydroxynitropyreny mohou být konjugovány glukuronovou kyselinou za vzniku polárního metabolitu, který se vylučuje převážně močí. Dále však hydroxynitropyren může podlehnout redukci nitroskupiny za vzniku aminopyrenu, což je aktivní metabolit, schopný tvořit sloučeniny s DNA [např. N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-aminopyren], a tedy je příčinou vzniku genové mutace. Rovněž však může být konjugován s glukuronátem po „překrytí“ aminoskupiny acetátem a jako polární látka vyloučen močí^[3, 19]. Studie metabolismu nitropyren prokázala, že nejtoxičtější pro lidské tělo je 4-nitropyren^[3]. Ten je však ve spalínách přítomen oproti 1-NP jen ve velmi malém množství. Dále bylo prokázáno, že lidský enzymatický aparát zpracovávající nitropyreny je odlišný

od bakteriálního, a dokonce velmi odlišný od aparátu laboratorních myší^[21]. Z toho vyplývá, že toxikokinetiku nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků nelze srovnávat mezidruhově.

Toxicita a karcinogenita byla prokázána u potkanů podáváním 2 mg 1-NP rozpuštěném v 0,2 ml dimetylsulfoxidu po dobu deseti týdnů, dávka dvakrát týdně (zdroj: online databáze TOXNET) Přímé důkazy mutagenity u lidí byly získány použitím rekombinantních enzymů, které rovněž umožnily metabolickou aktivaci

1-NP^[3]. Akutní účinky se projevují podrážděním očí, chronickým kašlem, rakovinou jazyka. Následkem chronické expozice může dojít k podráždění očí, bronchitidám, ekzémům. Je nefrotoxický a hepatotoxický – s možností vzniku rakoviny v postižených orgánech^[1].

1.4 Metody stanovení 1-nitropyrenu

Ke stanovení 1-NP lze použít různé analytické metody. Kvalitativní analýza je možná pomocí chromatografie na tenké vrstvě. Byl připraven imunochemický kit pro stanovení 1-NP s LOD řádově $10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ ^[22]. Dobře reprodukovatelné výsledky byly dosaženy použitím HPLC s chemiluminiscenční detekcí ($\text{LOD} = 1,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$) ^[23].

Dále kombinací technik GC-MS a GC-MS/MS, touto instrumentací je možné analyzovat i metabolity 1-NP^[24]. Rovněž byla použita metoda HPLC-MS pro stanovení obsahu 1-NP a to hydroxylované, redukované i nativní formy v městských exhalacích^[25]. Tyto metody jsou však časově i finančně náročné, a proto byla provedena studie možnosti analyzovat 1-NP pomocí moderních elektroanalytických metod, jmenovitě polarografie na klasické rtuťové kapkové elektrodě a voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě ($\text{LOQ} = 4 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$) ^[26]. Bylo dosaženo značně nižšího limitu detekce oproti stanovení 1-NP pomocí HPLC s UV detekcí. Selektivita stanovení může být dále zvýšena kombinací s extrakcí kapalina – kapalina či extrakcí na tuhé fázi ($\text{LOD} 0,2 \mu\text{g l}^{-1}$) ^[26]. V neposlední řadě bylo vypracováno stanovení na m-AgSAE v prostředí methanolu a BR pufru v poměru 7:3, v pH 12,0 metodami DCV ($\text{LOQ} = 2,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) a DPV ($\text{LOQ} = 5,45 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$) ^[27].

Úspěšná byla i stanovení 1-NP na uhlíkové pastové elektrodě na bázi kuliček ze skelného uhlíku^[28]. Výhodou této elektrody je její vysoká kompatibilita s pracovními roztoky obsahujícími velké množství organického rozpouštědla (např.

acetonitril či methanol). To je výhodou oproti použití pastové uhlíkové elektrody, u které dochází ve vyšších koncentracích organické fáze k vymývání materiálu elektrody do rozpouštědla. Dále je vysoce elektrochemicky reaktivní, má široké potenciálové okno, nízký šum a snadno se připraví, modifikuje a obnoví. Na této elektrodě probíhala měření metodou lineární scanovací voltametrie, diferenční pulsní voltametrie a voltametrie s akumulační adsorpcí ^[29]. Další typ elektrody, který je možné použít pro stanovení 1-NP, je borem dopovaná diamantová filmová elektroda, ($LOD = 8 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$) Stanovení bylo provedeno ve směsi methanol- voda v poměru 7:3 ^([30]).

Výhody elektroanalytických metod v tomto případě spočívají ve snížení limitu detekce, analýzy jsou časově a finančně méně náročné. Jsou tedy nezávislou alternativou k častěji používaným metodám chromatografickým a spektrometrickým pro stanovení rozmanitých elektroaktivních látek, což je výhodné i pro forenzní účely, kdy je často vyžadována možnost prokázat a stanovit danou látku dvěma nezávislými metodami.

Další zajímavou možností je kombinace imunochemických postupů s elektrochemickým stanovením. Byla vyvinuta metoda pracující s uhlíkovou elektrodou, na jejíž elektrochemicky aktivní části byla nanesena protilátka 1-NP. Za použití adsorpční voltametrie bylo dosaženo limitu detekce v řádu pmol.l^{-1} ^[31]. Nevýhodou tohoto uspořádání je malá robustnost, omezení použití některých organických rozpouštědel a prostorové nároky vylučující terénní použití. Z principu metody samé je rovněž nemožné použít tuto metodu v průtoku^[21].

1.5 Použitá pracovní elektroda

Pevné amalgámové elektrody jsou tvořeny kovy nebo jejich slitinami (např. Ag, Cu, Au, Ir, BiAg aj.), které se mohou smáčet rtutí a tvořit s ní pevné amalgámy. Vyrábí se tak, že se do vhodného nosiče o adekvátním průměru, kterým může být třeba kapilára nebo pipetová špička, napěchuje jemný kovový prášek. Výška sloupce prášku v nosiči je 0,5 až 1 cm. Do tohoto prášku se zanoří drát, který zprostředkuje kontakt mezi amalgamem a vodičem vedoucím do polarografického stojanu. Špička

se pak máčí v kapalně rtuť, tím se na povrchu vytvoří amalgám^[32]. Tento typ elektrod vykazuje v katodické oblasti vysoké přepětí vodíku a umožňuje pohodlnou práci jako s pevnými elektrodami. Regenerace jejich povrchu se většinou provádí elektrochemickou cestou. Mezi další výhody takových elektrod patří např. široký rozsah pracovních potenciálů, nižší zbytkový proud a šum, použitelnost v širším spektru rozpouštědel a základních elektrolytů, prakticky neomezená životnost elektrod a fakt, že elektrody vyrobené z pevných amalgámů jsou netoxické^[8, 33].

K dispozici je řada typů těchto elektrod, více podrobností je uvedeno v přehledném článku^[6]. Jsou to například:

- leštěné – pevné amalgamové elektrody neobsahující kapalnou rtuť (p-MeSAE), jejich povrch byl mechanicky vyleštěn.
- modifikované filmem – leštěné amalgamové elektrody pokryté rtuťovým filmem (MF-MeSAE);
- modifikované rtuťovým meniskem – leštěné MeSAE upravené rtuťovým meniskem (m-MeSAE); v této práci je to například m-AgSAE
- kompozitní – pracovní elektrody tvořené jemným amalgamovým prachem dispergovaným v pevném polymeru (MeSA-CE);
- pastové tekuté – pracovní elektrody tvořené jemným amalgamovým prachem dispergovaným ve vhodném roztoku (pastě) (MeSA-PE);

Tyto elektrody byly využity pro stanovení nejrozličnějších analytů, jejich přehled je uveden v přehledných člancích^[6, 10, 12]. Patří mezi ně například dusíkaté báze, ionty těžkých kovů, z aniontů to byly dusičnany, rhodanidy, iodičnany. Dále oligonukleotidy, DNA a poškození DNA, kyselina askorbová, ethanol, NPAU, a další karcinogeny, herbicidy a anticancerotika a jejich metabolity^[32].

Detekční limity se pro organické analyty a voltametrické metody dle výše uvedených prací^[6, 10, 12] zpravidla pohybují v rozmezí $10^{-7} - 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Některé typy ME-SAE byly použity v průtokových metodách, například pro stanovení 2-nitrofenolu ($\text{LOQ} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) a 4-nitrofenolu ($\text{LOQ} = 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) metodou HPLC-ED^[32]. Konkrétní typ Me-SAE v pipetové špičce se zúženým a prodlouženým tělem, využitý v této práci, ještě pro detekci organických ani anorganických analytů použit nebyl.

Pro stanovení 4-nitrofenolu byla však použita stříbrná amalgamová pastová elektroda v pipetové špičce s limitem detekce $0,3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ pro DPV [16].

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

Studovaná látka: 1-nitropyren (99%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Zásobní roztok 1-NP (byl připraven o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ rozpuštěním 0,0247 g 1-NP ve 100 ml methanolu (99,8%, Lachema, Praha, ČR). Roztoky 1-NP o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem. Všechny roztoky byly uchovávány ve tmě a v lednici ve skleněných nádobách.

Další použité chemikálie: kyselina boritá, kyselina octová, kyselina fosforečná, hydroxid sodný, siřičitan sodný (všechny čistoty p.a., Lachema, Praha, ČR), deionizovaná voda sloužící k přípravě všech vodných roztoků (Millipore, Milli-Q plus systém, Millipore, USA).

Brittonovy – Robinsonovy tlumivé roztoky (BR pufrů) o příslušném pH byly připraveny smísením $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ hydroxidu sodného s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, fosforečnou a octovou kyselinu, každou o koncentraci $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$.

2.2 Aparatura

Pro měření pH: přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH metrem Jenway (Jenway, Essex, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924005). Přesná hodnota pH^f (jedná se o hodnotu pH směsi vodná fáze – methanol) byla měřena tímto pH-metrem (kalibrován za laboratorní teploty standardními vodnými pufrů Sevac, Praha).

Měření stability zásobního roztoku: spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent technologies, Wilmington, USA). Použita byla křemenná kyveta o měrné tloušťce 0,5 cm.

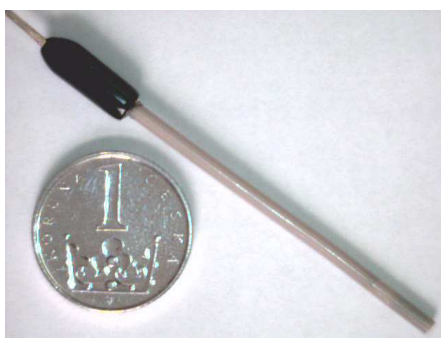
Voltametrie: software Polar Pro 5.1, pracující pod operačním systémem Windows XP (Microsoft Corporation, USA), sestava Eco-Tribo Polarograf (EcoTrend Plus, Praha).

Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení. Pro studium chování 1-NP byla použita meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda (m-AgSAE). Byla používána m-AgSAE připravená na Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR na oddělení biofyzikální chemie. Elektroda a

její části je zobrazena na obr. 2. Průměr amalgámového disku elektrody byl 0,3 mm (viz obr. 2C). Typ plastové pipetové špičky, jež byla použita jako nosič: Socorex Eppendorf 302.0010GR 10 μ l, délka 70,9 mm a průměr špičky cca 600 μ m, Socorex, Socorex Isba S.A. - Switzerland). Jako referentní elektroda byla použita argentochloridová elektroda (3 mol.l⁻¹ KCl, typ 66-EE009 Cypress Systems, Chelmsword, MA, USA). Je znázorněna na obr. 1. Jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda vlastní výroby s průměrem Pt drátku 400 μ m. Elektrody pracovaly ve tříelektrodovém zapojení. Pro vyhodnocení výsledků byl použit program Origin Pro 7.5 (OriginLab Corporation, USA).

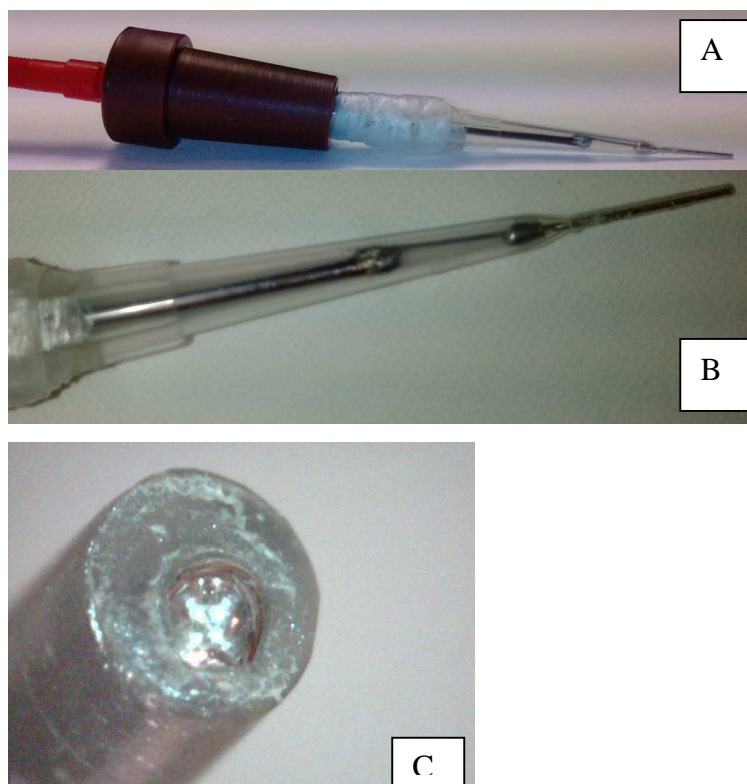
Při DPV byly na elektrody vkládány pulsy o šířce 100 ms a modulační amplitudě –50 mV. Při technice DCV i DPV byla použita rychlost nárůstu potenciálu 20 mV.s⁻¹. Při technice CV byla použita rychlost nárůstu potenciálu 100 mV.s⁻¹.

Použité polarografické nádoby byly dvojího druhu. Prvním byla skleněná nádoba pro 10 ml analyzovaného roztoku. Druhým typem byla skleněná miniaturizovaná nádoba pro měření v objemu 120 μ l (její celkový objem byl 220 μ l). Tato nádoba byla umístěna ve skleněné nádobce pro měření v objemu 1 ml, která je kompatibilní s držáky polarografu EkoTribo(Obr 5B).



Obr. 1

Referentní argentochloridová elektroda (3 mol.l⁻¹ KCl, typ 66-EE009 (Cypress Systems, Chelmsword, MA, USA).



Obr. 2

Pracovní elektroda m-AgSAE .

A: Celkový pohled na pracovní elektrodum-AgSAE .

B: Detail pracovní elektrody, na kontakt je připájený Pt drát, který je zanořen do amalgamu v zakončení špičky.

C: Zakončení pipetové špičky se zřejmým Hg meniskem.

2.3 Pracovní postupy

V rámci měření byly prováděny s pracovní elektrodou dvě následné operace, kterými byl obnovován povrch elektrody:

Amalgamace: ponořením elektrody do kapalně rtuti asi na 15 s se obnovil celý meniskus. Amalgamace byla prováděna vždy po jednom týdnu nebo po dlouhodobém přerušení práce. Kvalitu menisku bylo nutno pravidelně kontrolovat, při větších otřesech či míchání se může poškodit, což se projeví například nestálostí signálu elektrody.

Elektrochemická aktivace: aktivace byla prováděna v roztoku $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ KCl, který nebyl probubláván dusíkem, vložením napětí -2.2 V po dobu 300 s. Při aktivaci docházelo k elektrochemickému čištění povrchu elektrody. Aktivace byla prováděna po amalgamací, při pasivovaném povrchu elektrody a při přerušení práce po dobu delší než jednu hodinu.

Odstranění kyslíku z roztoků pro voltametrii : Před každým měřením bylo přidáno automatickou pipetou 20 μl nasyceného roztoku siřičitanu sodného (26,6 % roztok ve vodě při teplotě 20°C) pro měření ve 120 μl nádobce a skleněnou pipetou 2 ml pro měření v 10 ml nádobce za účelem odstranění kyslíku z roztoku.

Při studu vlivu pH byly připraveny roztoky o výsledné koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ tak, aby nedocházelo k vylučování 1-NP, tj. vodná fáze byla přidána k roztoku až nakonec. Výsledný poměr metanol – vodná fáze byl 7:3, tento poměr byl experimentálně určen v práci [27]. Takto připravený roztok byl promíchán, převeden do polarografické nádoby a zbaven kyslíku přidavkem siřičitanu sodného. Následně byl zvoleným programem proveden záznam voltametrické křivky metodou DC nebo DP voltametrie. Slepý vzorek (základní elektrolyt) byl připraven obdobným způsobem. Měření probíhala za laboratorní teploty, každá křivka byla zaznamenána minimálně třikrát. Získané křivky byly exportovány a vyhodnoceny v programu Originu Pro 7.5 (OriginLab Corporation, USA).

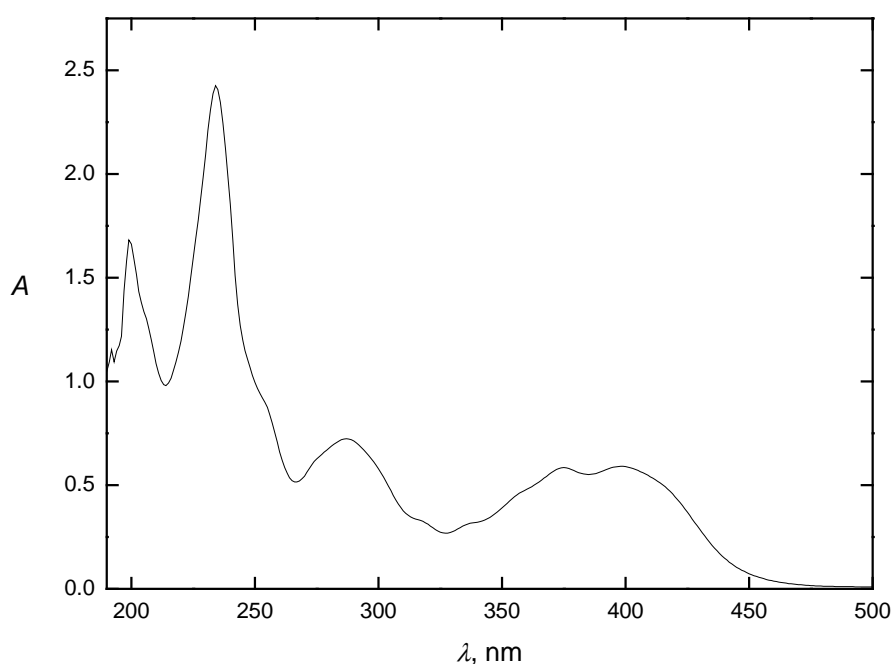
Dále byly změřeny cyklické voltamogramy 1-NP v prostředí methanol – BR pufr pH 12,0 (7:3) rychlostí 100 mV/s.

Byl sledován vliv změny způsobu vybublávání kyslíku. Bližší popis je uveden v kapitole 3.1 věnované konstrukci cely.

Kalibrace byla provedena ve dvou objemech základního elektrolytu, a to ve 100 μl a v 10 ml. Základní elektrolyt byl směsí methanolu a BR pufru o pH 12,0 v poměru 7:3. K tomuto roztoku bylo přidáno ještě 20% objemových čerstvě připraveného nasyceného roztoku siřičitanu sodného. Po jeho přidavku byla směs promíchána a po té byly změřeny voltamogramy. Mez stanovení (LOQ) byla spočítána jako desetinásobek SD signálu při opakovaném měření ($n = 10$) v nejnižší měřitelné koncentraci, dosazený do příslušné kalibrační rovnice.

2.4 Stálost zásobního roztoku 1-nitropyrenu

Stálost zásobního roztoku 1-NP o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byla sledována spektrofotometricky v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 0,5 cm. Absorpční spektrum 1-NP je zobrazeno na obr. 3. Zásobní roztok bylo nutno před každým měřením naředit na $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ pro dosažení optimálních hodnot absorbance. Referentní kyveta byla naplněna methanolem. Z výsledků (viz tab. 1) vyplývá, že zásobní roztok 1-NP je dostatečně stálý nejméně po dobu jednoho měsíce.



Obr. 3

Absorpční spektrum roztoku 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v methanolu. Měřeno proti čistému methanolu v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 0,5 cm.

Tab. 1

Spektrofotometrické měření stálosti zásobního roztoku 1-nitropyrenu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$. Molární absorpční koeficient je $\varepsilon_M^{288} = 130400 \text{ l/mol.m}$. Relativní absorbance je vztažena k prvnímu dni.

Dny	Absorbance roztoku		Relativní absorbance [%]	
	288 nm	372 nm	288 nm	372 nm
1	0,652	0,574	100.0	100.0
2	0,651	0,583	100,6	101,7
4	0.66	0,587	102,3	102,2
8	0,634	0,581	98.0	99.0
31	0,654	0,575	100,3	100,5

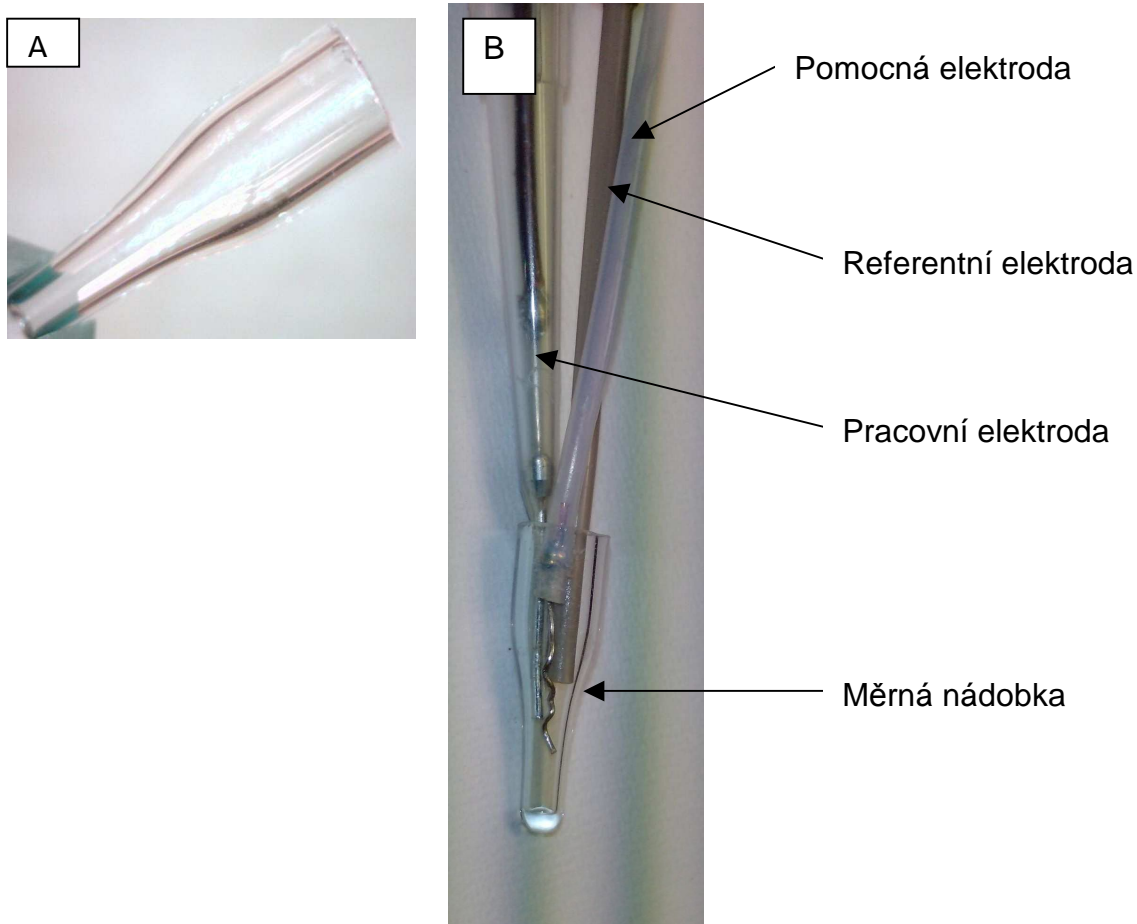
3. Výsledky a diskuze.

3.1. Konstrukce miniaturizované měřicí cely

Pro převod měření do mikro-měřítka bylo nutno nejprve navrhnout měřicí celu.

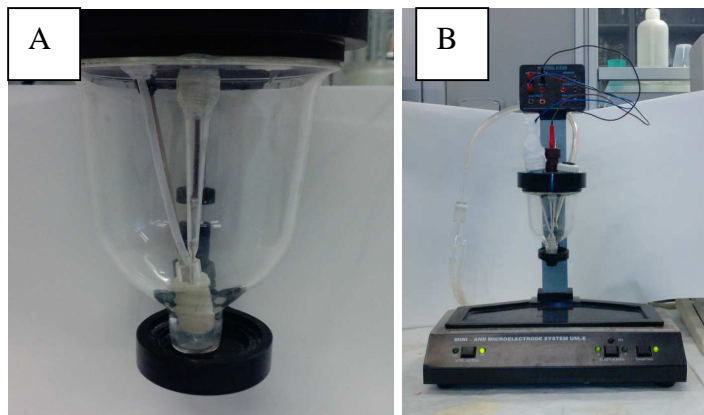
Cílem bylo provádět měření v objemu vzorku cca 100 μl . Za tímto účelem byla zhotovena speciální vložka, do které se vloží malá měrná nádobka o objemu 220 μl . Celý systém se vloží do měřicí cely systému Eco-tribo, která je upevněna v držáku polarografu, jak je zřejmé z obr. 5. Celý prostor je tak relativně utěsněn a v průběhu zavádění dusíku do cely nedochází k difuzi kyslíku z vnějšího prostoru.

Měrná nádobka byla vytvořena zkrácením vzorkovnice pro HPLC autosampler (vialky). Detail měrné nádoby samotné a s elektrodami je na obr. 4. Zúžené dno nádoby umožňuje měřit v menších objemech. Nádobka byla vložena do 10 ml voltametrické cely, upravené pro měření v objemu 1 ml, která byla svým tvarem nejvhodnější. V případě použití bublání dusíkem pro odstranění kyslíku bylo použito bublátko vytvořené z bužírky drátu, která byla zasunuta do pipetové špičky a napojena na hadici z promývačky, jak je znázorněno na obr. 6



Obr. 4

Měrná nádoba pro voltametrii, tvořená zkrácenou vzorkovnicí pro HPLC autosampler. A: bez elektrod; B: s elektrodami (referenční argentochloridová elektroda s $3 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KCl}$, pomocná Pt drátková, pracovní m-AgSAE).



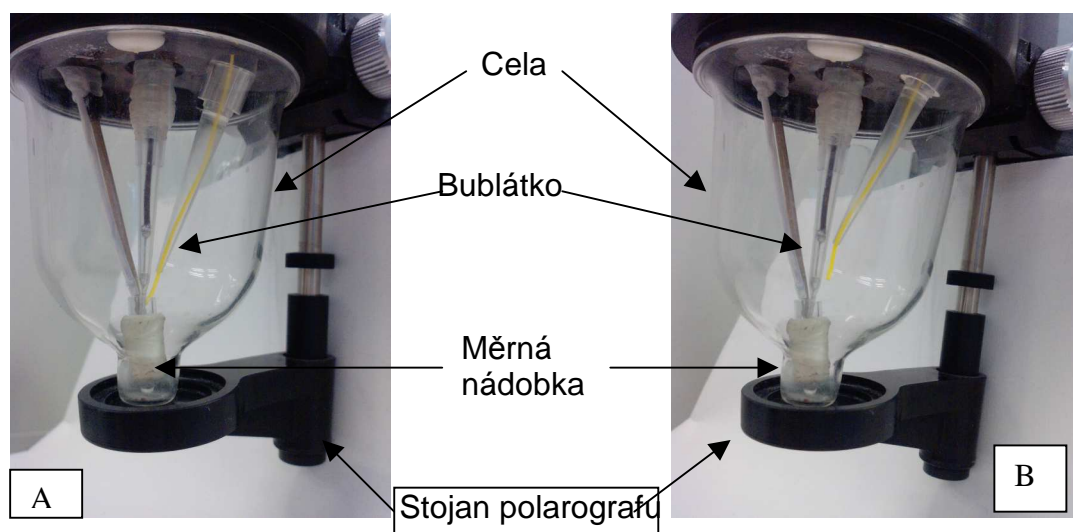
Obr. 5

Měřicí systém tvořený měrnou nádobkou v měřící cele, se zasunutými elektrodami a upevněný v držáku polarografu. A: detail cely, B: polarograf Eco- Tribo s celou a zapojenými elektrodami.



Obr.6

Bublátko, vytvořené pomocí bužírky zasunuté do pipetové špičky, která byla připojena na vývod z promývačky



Obr. 7

A: přívod dusíku do roztoku v měrné nádobce.

B: přívod dusíku nad roztok do prostoru měřící cely.

3.2 Odstranění kyslíku

1-NP obsahuje redukovatelnou nitroskupinu, a tak měření probíhá v katodické oblasti. Proto bylo nutno nejprve vyřešit odstranění kyslíku z měřeného roztoku. Byly testovány tři způsoby odstranění kyslíku: 1) vybublávání kyslíku dusíkem z roztoku přímo, 2) rovnovážné odstraňování přiváděním dusíku do prostoru cely a 3) přidavek siřičitanu sodného ve formě nasyceného roztoku.

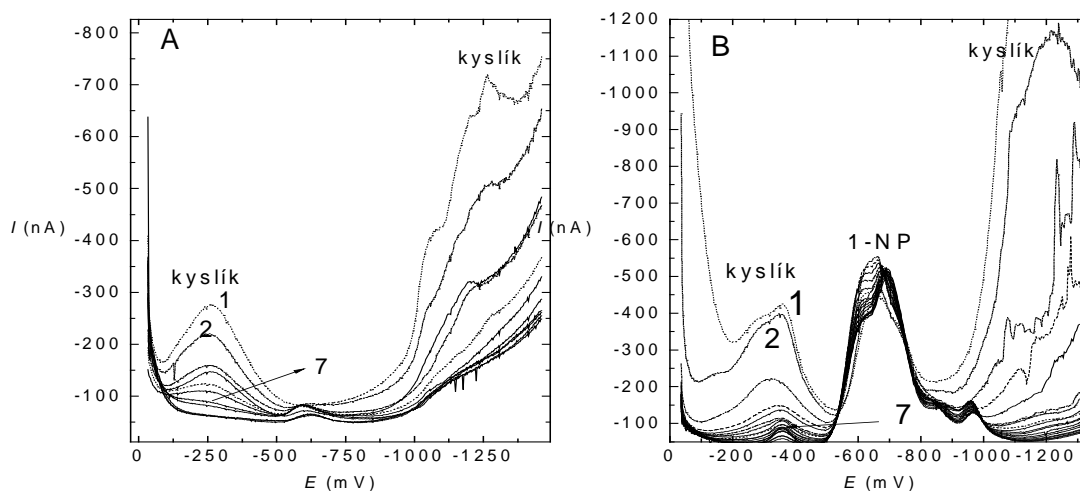
Ad 1) Nejprve byl dusík zaváděn bublátkem přímo do roztoku v cele. (Obr. 7 A) Výsledkem pokusu bylo vyloučení možnosti bublání dusíkem přímo v měřeném roztoku, docházelo totiž k vytěkání methanolu ještě dříve (za 3,5 min.), než byl dusíkem kyslík dostatečně vytěsněn a než bylo možno zahájit měření.

Ad 2) Ve druhém pokusu bylo prověřeno, zda je možné problém s kyslíkem vyřešit zavedením přívodu dusíku do cely. (Obr. 7 B) Do nádobky pro měření v objemu 120 μl byly umístěny roztoky o pH 12,0, tj. nejprve základní elektrolyt tvořený methanolem a BR puforem o pH 12,0 v poměru 7:3, a pak roztok 1-nitropyrenu v témže základním elektrolytu a metodou DPV byly měřeny voltamogramy v intervalu 5 minut. Dusík byl přiváděn do cely, ve které probíhalo měření, a byl sledován čas potřebný k rovnovážnému vytěsnění kyslíku z roztoku v měrné nádobce.

Vytěsnění kyslíku z cely má za následek zpětné vypařování kyslíku z měřeného roztoku, neboť dojde ke snížení tenze par kyslíku nad roztokem. Na obr. 8 je ukázáno měření probíhající v základním elektrolytu a v roztoku 1-nitropyrenu v průběhu zavádění dusíku nad roztok.

Mezi křivkami je 5 minutový rozestup, první křivka byla změřena ještě před zapojením dusíku. Kyslík se projevuje dvěma signály. Tyto dva signály celkově odpovídají redukci kyslíku na vodu. První signál náleží redukci kyslíku na peroxid vodíku za účasti 2e^- a druhý pík redukci vodíku na vodu za účasti 2e^- . 1-NP přísluší pík u $[-650\text{ mV}]$, kyslík se projevuje píkem u -250 mV a dále postupným nárůstem od cca $[-700\text{ mV}]$.

Do základního elektrolytu bylo nutné přivádět dusík minimálně 35 minut, než došlo k odstranění rušivého vlivu kyslíku. Experimenty s dusíkem ukázaly, že pro rutinní analýzu není možné tuto metodu používat vzhledem k příliš dlouhému času vytěsňování kyslíku.



Obr. 8

Voltamogramy základního elektrolytu složeného z methanolu a BR-pufu o pH 12,0 v poměru 7:3 (A) a téhož základního roztoku s přidavkem 1-NP o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ (B) Měřeno metodou DPV na m-AgSAE, pH^f měřeného roztoku 12,0. Doba zavádění dusíku: 0 min (1), 5 min (2), 10 min (3), dále vždy po 5 min až do $t = 35 \text{ min}$ (7).

Ad 3) Dále byl proveden pokus s přidáním 20 μl nasyceného roztoku siřičitanu sodného. Ten byl přidán těsně před zahájením měření ke 100 μl základního elektrolytu bez přidavku a s přidavkem 1-NP. Jako základní elektrolyt byl použit methanol s BR pufrem o daném pH (pH 2,0, pH 7,0 a pH 12,0) ve výsledném poměru 7:3. Vlivem přidavku klesá pH roztoků v řádu dvou desetín jednotky pH. Voltamogramy byly měřeny vždy před přidavkem siřičitanu a po přidavku metodou CV a DCV. K největší změně potenciálového okna dochází v kyselém pH (pH BR pufru je 2,0). Okno je zúženo z katodické i anodické strany o 200-500 mV. V neutrálním pH (pH BR pufru je 7,0) je patrné zúžení z obou stran a to 100-300 mV. V zásaditém pH (pH BR pufru je 12,0) dochází k posunu až o 100 mV z anodické strany a na katodické straně je posun o 80 mV. Voltamogramy naměřené metodou DCV a CV jsou pro pH BR pufru 2,0; 7,0; 12,0 znázorněny na obr. 9,10, a 11 a příslušné rozsahy potenciálového okna jsou zřejmé z tab. 2.

Potenciálové okno se tedy zmenšuje především z anodické strany a nejméně stabilní je v kyselém pH, zde se okno zužuje o cca 300 mV na katodické i anodické straně. V zásaditém pH se relativně téměř nemění. Na katodické straně došlo v kyselém pH

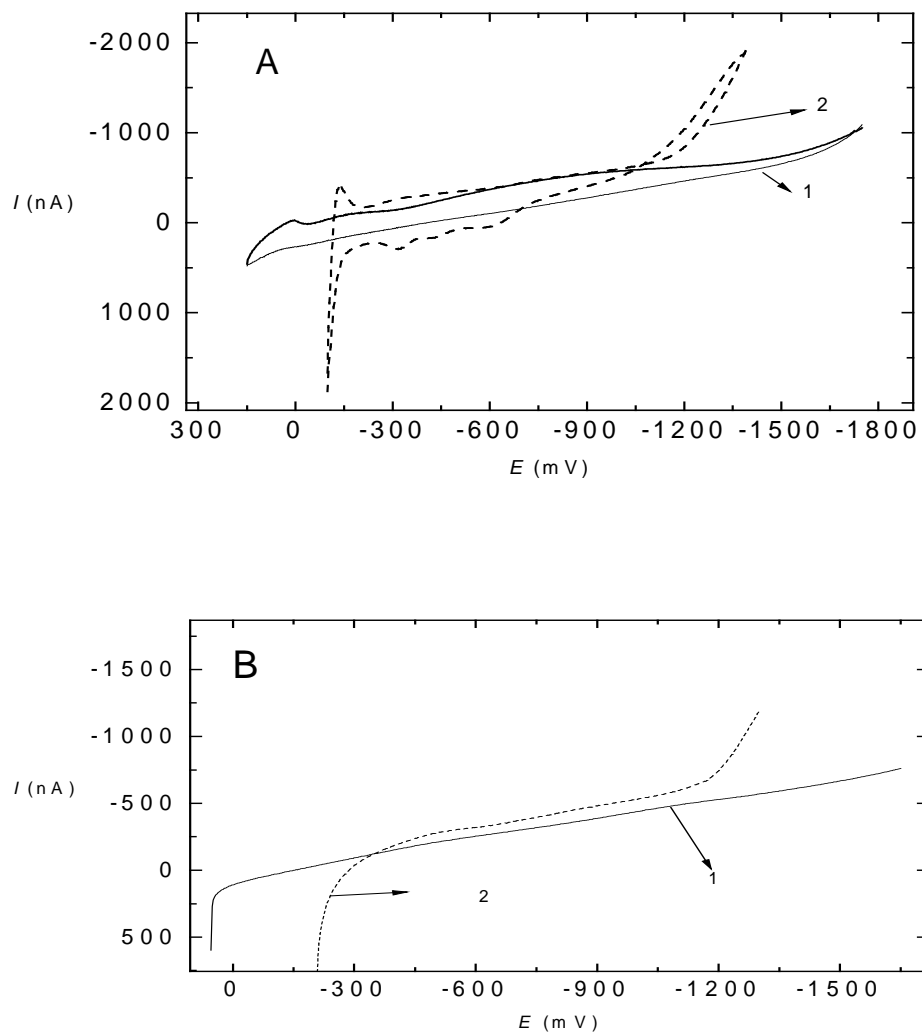
k posunu ke kladnějším potenciálům, v neutrálním a zásaditém pH dochází k nepatrnému posunu k zápornějším potenciálům.

Dále bylo ověřeno, jak přídavek siřičitanu sodného ovlivňuje výšku a tvar píku 1-NP. Na obr. 12 jsou zaznamenány DP voltamogramy 1-NP v kyselém, neutrálním a zásaditém základním elektrolytu. Odstranění kyslíku je zřejmé z poklesu jeho signálů na obr. 12 B a C pro neutrální a zásadité pH. Zde je také zřejmé, že výška a poloha píku 1-NP není přídavkem nasyceného roztoku siřičitanu sodného zcela ovlivněna. Pro kyselé pH (pH BR pufru 2,0) není pík 1-NP v roztoku obsahujícím kyslík vůbec zřejmý a po jeho odstranění přídavkem siřičitanu je jeho výška malá v porovnání s neutrálním a zásaditým pH. Toto pH je však pro stanovení 1-NP nejméně vhodné, jak je dále prokázáno v kapitole studia vlivu pH na DC voltamogramy (v kapitole 1.4) a na DP voltamogramy (v kapitole 1.6).

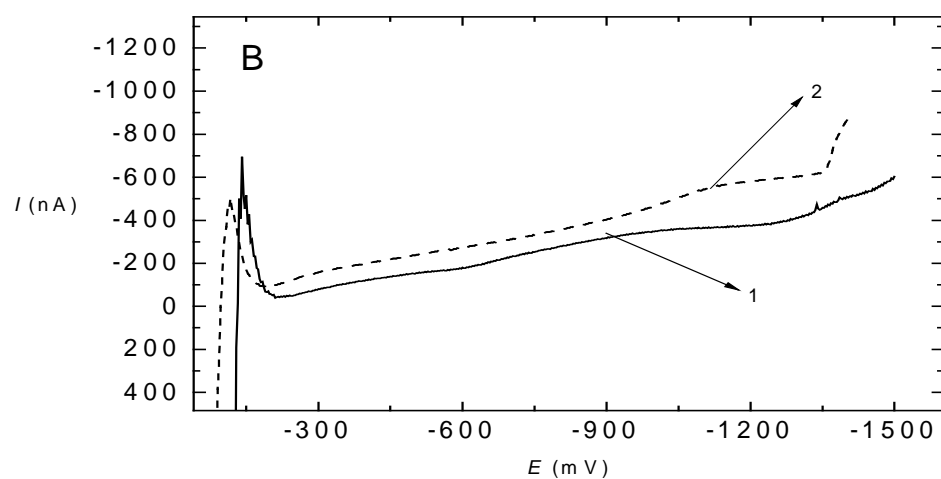
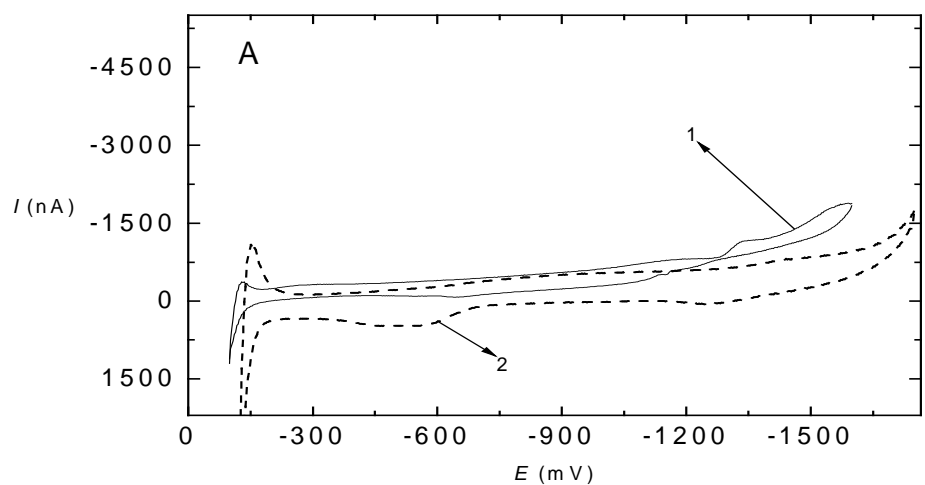
Ačkoli postup s použitím siřičitanu sodného jako činidla odstraňujícího vliv kyslíku na měření nemůže být univerzálním řešením z důvodu ovlivňování potenciálového okna, a případného vlivu na analyt (redukci), v případě 1-NP se ukázalo toto řešení jako vhodné. Zkonstruovaná detekční cela tak mohla být použita bez dalších úprav umožňujících odstranění kyslíku pomocí vybublávání.

Tabulka 2: Rozsah potenciálového okna m-AgSAE měřený metodami CV a DCV v závislosti na pH základního elektrolytu a přítomnosti siřičitanu sodného, který byl přidáván kvůli odstranění kyslíku. Základní elektrolyt byl tvořen methanolem a BR pufrem o daném pH v poměru 7:3. Celková změna: vyjadřuje celkovou změnu šíře potenciálového okna, nikoli posun celého okna.

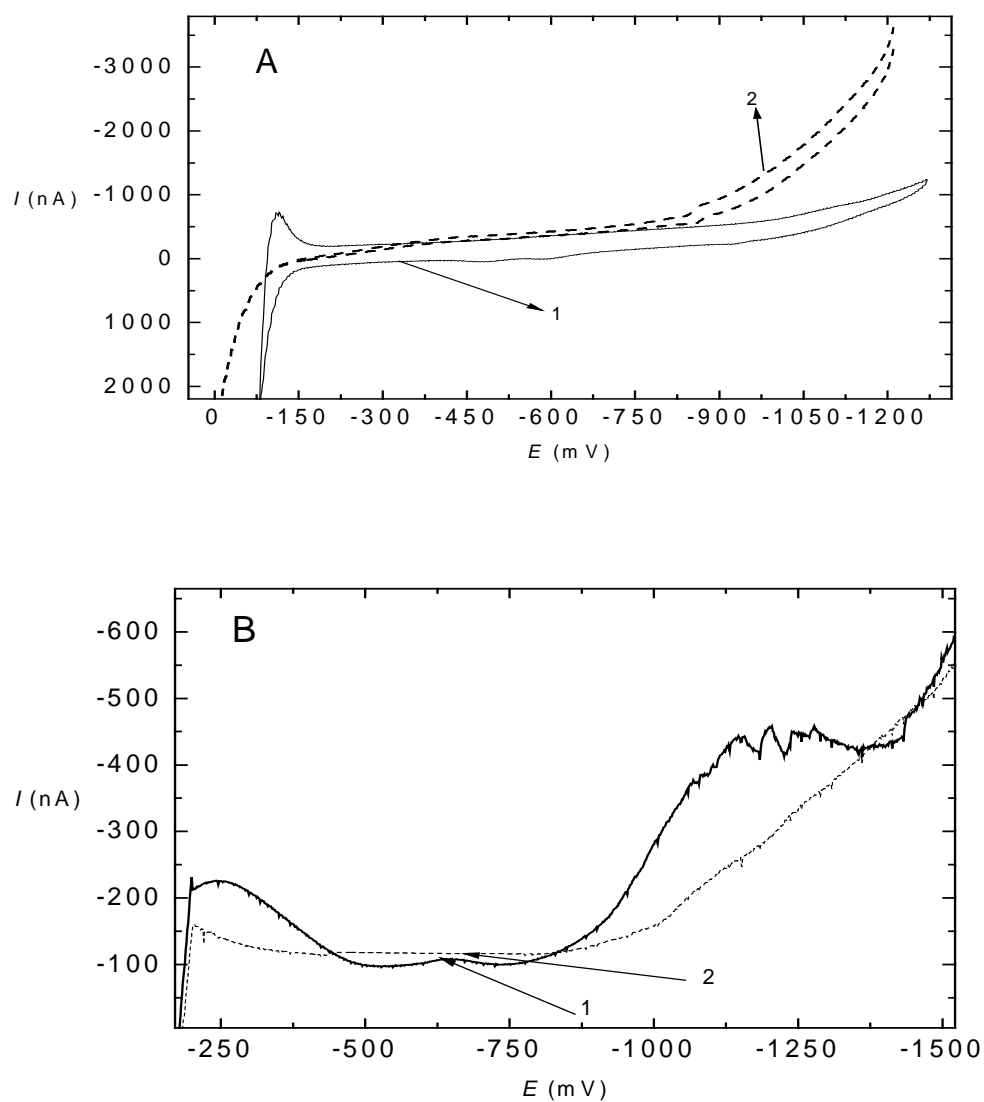
pH BR pufru	pH ^f	metoda	Rozsah potenciálového okna (mV)				celková změna (mV)
			bez přídavku Na ₂ SO ₃		s přídavkem Na ₂ SO ₃		
2,0	2,8	CV	150	-1750	-150	-1200	-850
		DCV	55	-1650	-400	-1200	-905
7,0	8,4	CV	-200	-1300	-230	-1650	320
		DCV	-200	-1500	-230	-1400	-130
12,0	12.1	CV	-70	-1250	-80	-1070	-190
		DCV	-300	-1150	-375	-900	-325



Obr. 9 : Voltamogramy měřené na m-AgSAE metodou CV (A, rychlost polarizace 100 mV/s) a DCV (B, rychlost polarizace 20 mV/s). Základní elektrolyt: 1- bez siřičitanu sodného. 2 - s přidavkem siřičitanu sodného. ZE tvořila směs methanol - BR pufr o pH^f 2,8 v poměru 7:3.

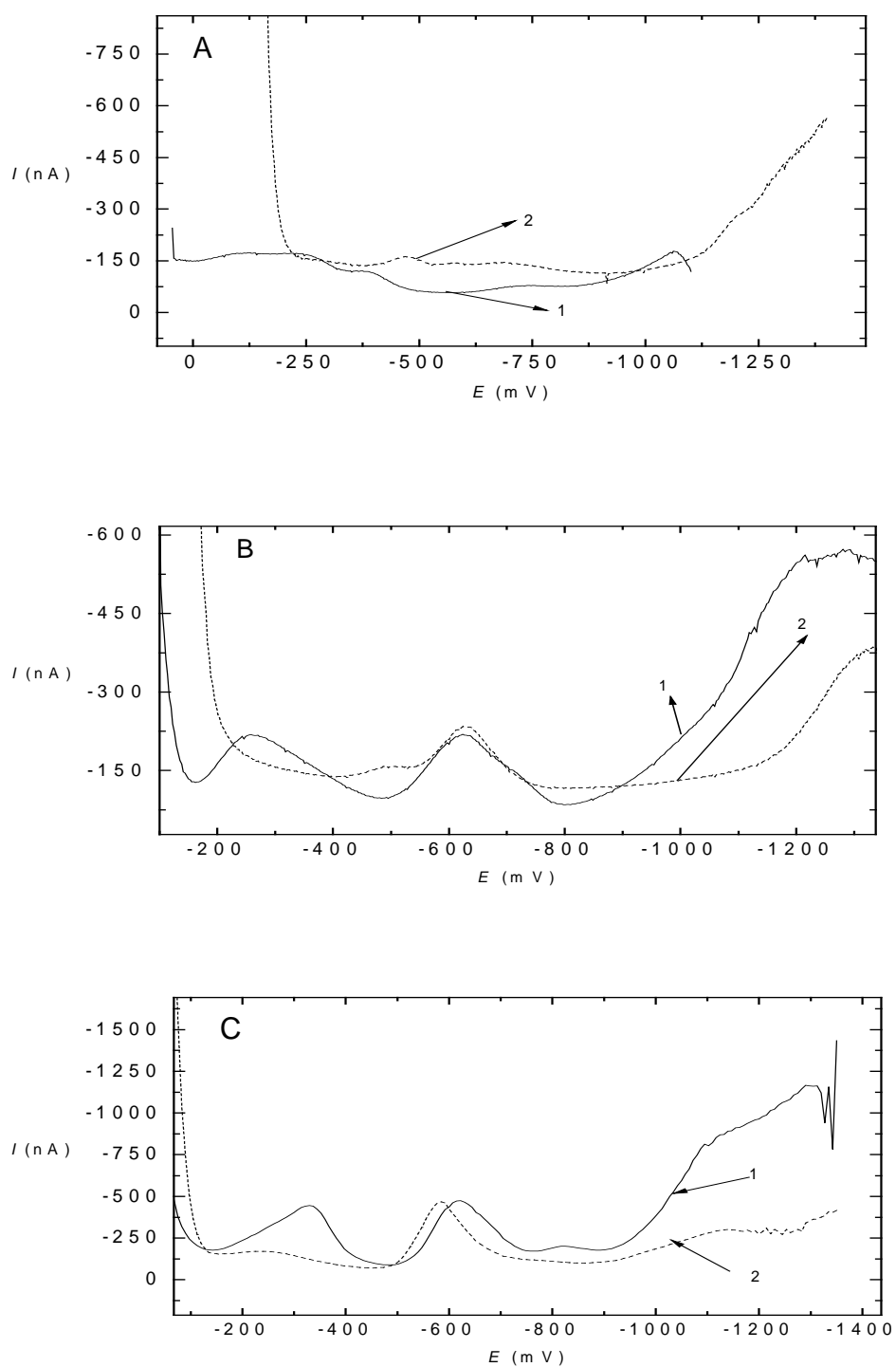


Obr. 10: Voltamogramy měřené na m-AgSAE metodou CV (A) a DCV (B). (A, rychlost polarizace .100 mV/s) a DCV (B, rychlost polarizace 20 mV/s) Základní elektrolyt: 1: bez siřičitanu sodného. 2: s přidavkem siřičitanu sodného. ZE tvořila směs methanol - BR pufr o pH 7,0, pH^f 8,4 v poměru 7:3



Obr. 11:

Voltamogramy měřené na miniaturizované m-AgSAE metodou CV (A) a DCV. (A, rychlost polarizace .100 mV/s) a DCV (B, rychlost polarizace 20 mV/s) Základní elektrolyt. (B) 1: bez siřičitanu sodného. 2: s přidavkem siřičitanu sodného ZE tvořila směs methanol- BR pufr o pH 12,0, pH^f 12,1 v poměru 7:3



Obr. 12:

Voltamogramy 1-NP o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ měřené na m-AgSAE metodou DPV v základním elektrolytu o pH^f 2,8 (A), 8,4 (B) a 12,1 (C). 1 - bez přídavku a 2 - s přídavkem siřičitanu sodného. . Základní elektrolyt tvořila směs methanol- BR pufr o pH 12,0 v poměru 7:3.

3.3 DC voltametrie 1-nitropyrenu

V další části práce byla miniaturizovaná detekční cela použita pro optimalizaci stanovení 1-NP jako modelového analytu s využitím DC a DP voltametrie na m-AgSAE zkonstruované z pipetové špičky. Kyslík byl z roztoků odstraňován přidavkem siřičitanu sodného. Vždy byl studován vliv pH na voltamogramy, proměřeny kalibrační závislosti a určena opakovatelnost měření.

3.3.1 Vliv pH

Vliv pH na DC voltamogramy byl sledován v základním elektrolytu BR pufr – methanol (3:7) pro pH BR pufru v rozmezí 2,0 – 12,0. Látka poskytuje téměř v celém měřeném rozsahu pH 2 píky. Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu píku E_p na pH^f roztoku určen vztah pro první pík:

$$E_{p1} [\text{mV}] = -12,33\text{pH}^f - 509,2 \quad (\text{korelační koeficient } 0,976)$$

Pro druhý pík nebylo možno sestavit lineární závislost, ale je partneré, že výška píku roste se vzrůstajícím pH.

Zjištěné závislosti potenciálu píků E_p a proudu píků I_p na pH roztoku jsou uvedeny v tab. 3. Zaznamenané voltametrické křivky jsou zobrazeny na obr. 13. Závislosti potenciálu píku E_p a proudu píku I_p na pH jsou zobrazeny na obr. 14 a 15. Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 12,0. V tomto prostředí poskytovala látka dobře vyvinutý a vyhodnotitelný pík. Jeho výška je sice srovnatelná s oblastí cca pH 5,0 – 8,0, pro pH 12,0 však měření měla vyšší opakovatelnost.

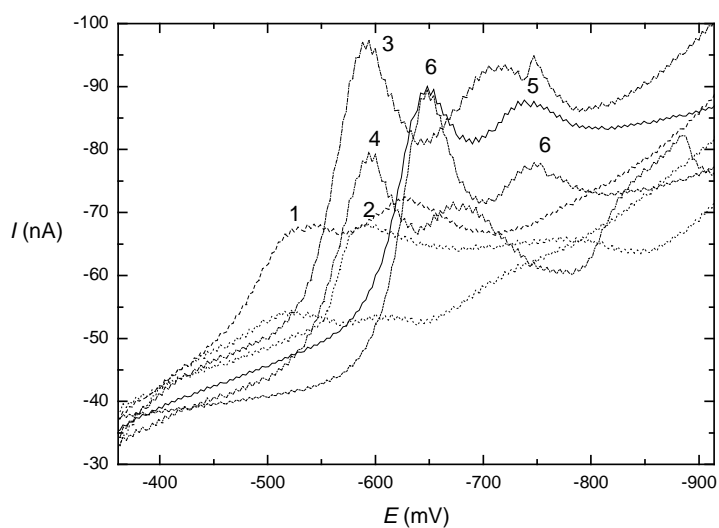
Tab. 3

Vliv pH na DC voltamogramy 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o příslušném pH (7:3).

pH	pH^f	$E_{p1} [\text{mV}]$	$E_{p2} [\text{mV}]$	$I_{p1} [\text{nA}]$	$I_{p2} [\text{nA}]$
2,0	2,8	-524	-25,2	-617	-14
3,0	4,2	-536	-21,2	-626	-22
4,0	5,2	-540	-26	- ^a	- ^a
5,0	6,4	-564	-47	-657	-27,8
6,0	7,3	-563	-28	-661	-22,8

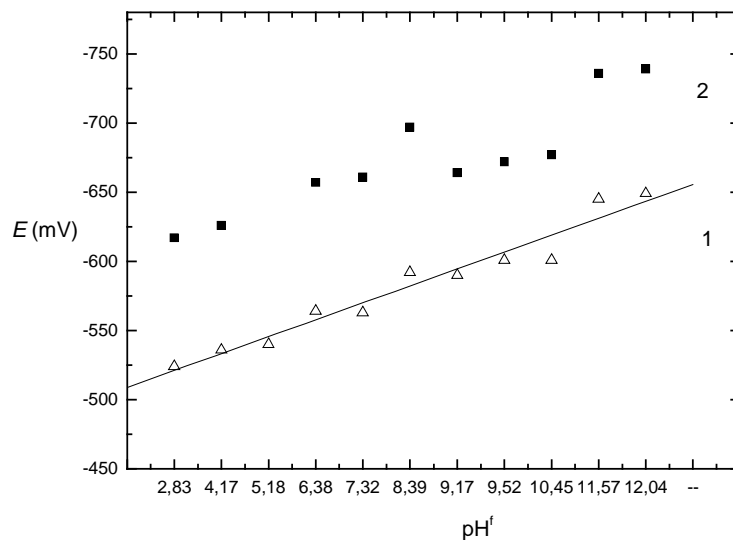
7,0	8,4	-592	-46,4	-697	-22,2
8,0	9,2	-590	-43,6	-664	-25,4
9,0	9,5	-601	-40,8	-672	-26,8
10,0	10,5	-601	-39,4	-677	-18,6
11,0	11,6	-645	-29,8	-736	-20,2
12,0	12,1	-649	-47,2	-739	-22,6

^a – pík nebyl za daných podmínek pozorován



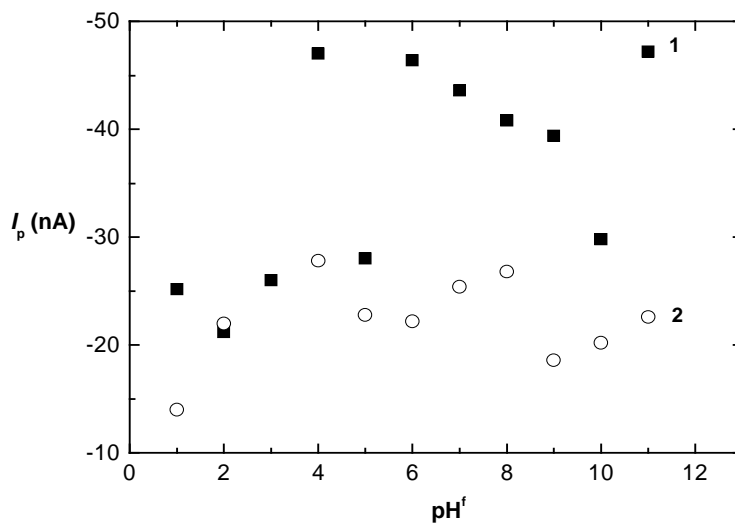
Obr. 13

Voltamogramy 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufru (7:3), pH BR pufru: 3,0 (1); 5,0 (2); 7,0 (3); 9,0 (4); 11,0 (5); 12,0 (6).



Obr. 14

Závislost potenciálu prvního a druhého píku E_{p1} a E_{p2} 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^f roztoku, měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr (7:3).



Obr. 15

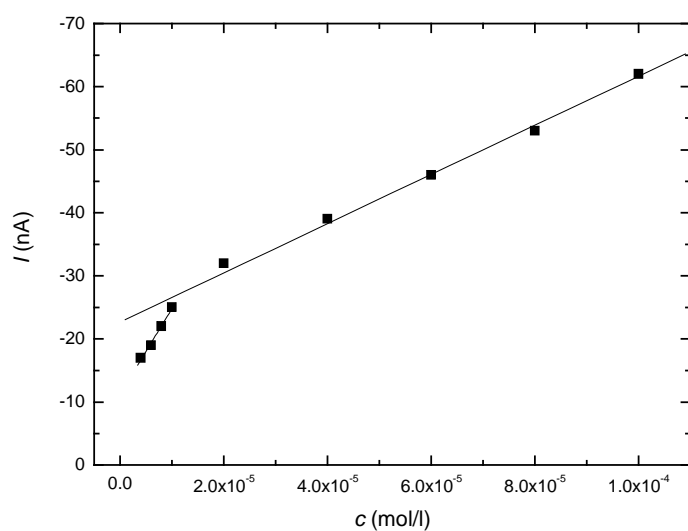
Obr 15. Závislost proudu výšky prvního a druhého píku I_{p1} (1) a I_{p2} (2) 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^f roztoku, měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr (7:3).

3.3.2 Koncentrační závislosti

Koncentrační závislosti pro 1-NP byly proměřeny metodou DCV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr (7:3) o pHⁱ 12,1 v koncentračním rozmezí ($4 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-4}$) v objemu 120 μ l. Jako nejnižší měřitelná koncentrace byla zvolena $c = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Na obr. 16 je zobrazena kalibrační křivka pro celé rozmezí měřených koncentrací, na obr. 17 jsou zobrazeny naměřené voltamogramy. Parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v tab. 4. Kalibrační závislost bylo nutno rozdělit na dva lineární úseky, jelikož pro celé měřené rozmezí koncentrací závislost není lineární. Nelinearita kalibrační závislosti 1-NP nebyla dříve při voltametrických stanoveních pozorována ani pro práci s klasickou m-AgSAE zkonstruovanou ze skleněné kapiláry pro stanovení v objemu 10 ml ^[27], ani pro jiné elektrodové materiály (HMDE, DME, borem dopované diamant^[11, 32, 34]). Proto byla nelinearita kalibrační závislosti pro m-AgSAE zkonstruované z pipetové špičky ověřena i pro objem vzorku 12 ml. Stejným postupem jako v předchozím případě. Obr. 18 zobrazuje kalibrační závislost měřenou v objemu vzorku 12 ml a na obr. 19 jsou příslušné voltamogramy. Parametry koncentračních závislostí jsou uvedeny v tabulce 5. Vzhledem k tomu, že nutnost rozdělit koncentrační závislost na dva lineární úseky se projevila v objemu 120 μ l i v objemu 12 ml, je patrné, že příčinou tohoto jevu je odezva elektrody, nikoli objem vzorku.

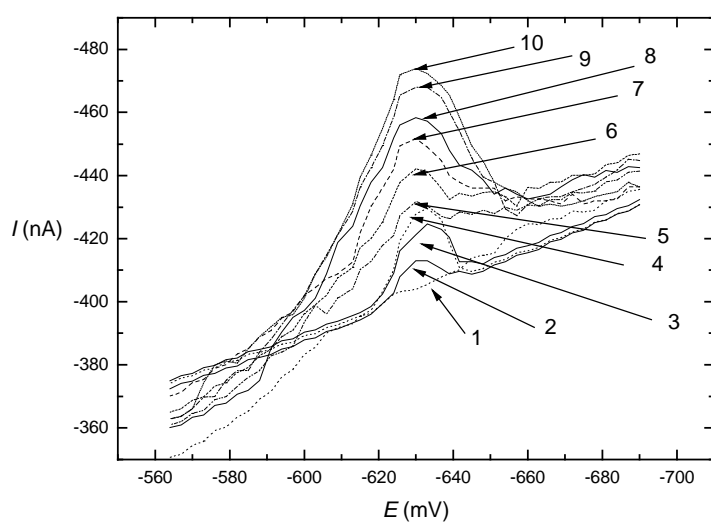
Určení opakovatelnosti výšky píků při použitém režimu bylo provedeno opakovaným změřením DC voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci ($c = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) a to jak v objemu 120 μ l, tak v objemu 12 ml.

Pro stanovení v objemu 120 μ l je výška I_p rovna ($-17,0 \pm 0,3$) nA, hodnota RSD = 1,59 %. Pro stanovení v objemu 12 ml je výška I_p rovna ($-64,2 \pm 1,8$) nA, hodnota RSD = 2,78 %.



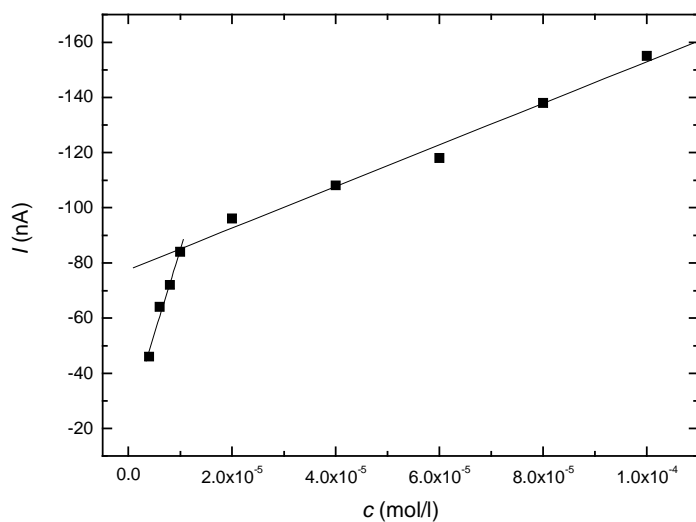
Obr. 16

Závislost proudu píku I_p na koncentraci 1-NP v rozmezí $4.10^{-6} - 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR-pufr (7:3) v objemu 120 μl .



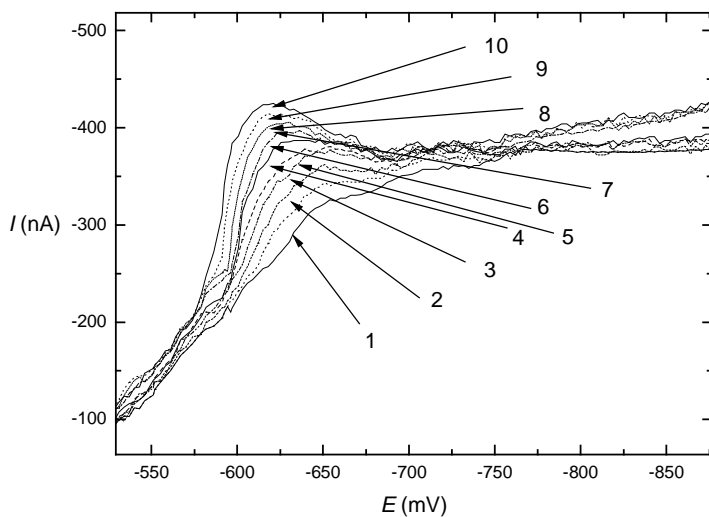
Obr. 17

Voltamogramy 1-NP měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 12,0 (7:3) v objemu 120 μl , $c(1\text{-NP}) [\text{mol.l}^{-1}]$: 0 (1); $4 \cdot 10^{-6}$ (2); $6 \cdot 10^{-6}$ (3); $8 \cdot 10^{-6}$ (4); $1 \cdot 10^{-5}$ (5); $2 \cdot 10^{-5}$ (6); $4 \cdot 10^{-5}$ (7); $6 \cdot 10^{-5}$ (8); $8 \cdot 10^{-5}$ (9); $10 \cdot 10^{-5}$ (10)



Obr. 18

Závislost proudu píku I_p na koncentraci 1-NP v rozmezí $4 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR-pufr (7:3) v objemu 12,0 ml.



Obr.19

Voltamogramy 1-NP měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 12,0 (7:3) v objemu 12,0 ml, c (1-NP) [mol.l^{-1}]: 0 (1); $4 \cdot 10^{-6}$ (2); $6 \cdot 10^{-6}$ (3); $8 \cdot 10^{-6}$ (4); $1 \cdot 10^{-5}$ (5); $2 \cdot 10^{-5}$ (6); $4 \cdot 10^{-5}$ (7); $6 \cdot 10^{-5}$ (8); $8 \cdot 10^{-5}$ (9); $10 \cdot 10^{-5}$ (10)

Tab. 4

Parametry kalibračních závislostí 1-NP v koncentračním rozmezí $(4-10) \cdot 10^{-6}$ a $(1-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR-pufr (7:3) objemu 120 μl .

Koncentrace [mol.l ⁻¹]	Úsek [nA]	Směrnice [nA.l.mol ⁻¹]	Korelační koeficient	LOQ [mol.l ⁻¹]
$(1-10) \cdot 10^{-5}$	-22,69	$-3,99 \cdot 10^5$	0,9966	-
$(4-10) \cdot 10^{-6}$	-11,3	$-1,35 \cdot 10^6$	0,9959	$3,84 \cdot 10^{-6}$

Tab. 5

Parametry kalibračních závislostí 1-NP v koncentračním rozmezí $(4-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a $(1-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR-pufr (7:3) objemu 12 ml.

Koncentrace [mol.l ⁻¹]	Úsek [nA]	Směrnice [nA.l.mol ⁻¹]	Korelační koeficient	LOQ [mol.l ⁻¹]
$(1-10) \cdot 10^{-5}$	-77,56	$-7,54 \cdot 10^5$	0,9942	-
$(4-10) \cdot 10^{-6}$	-23,8	$-6,12 \cdot 10^6$	0,9876	$3,56 \cdot 10^{-6}$

3.4 Diferenční pulsní voltametrie 1-nitropyrenu

3.4.1 Vliv pH

Vliv pH na chování 1-nitropyrenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) při DPV na m-AgSAE byl sledován v prostředí methanol – BR pufr pH 2,0 až 12,0.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu píku E_p na pH v rozmezí pH 3,0 až 12,0 určen vztah:

$$\text{první pík: } E_{p1} [\text{mV}] = -13.26 \text{ pH}^f - 440.34 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9758)$$

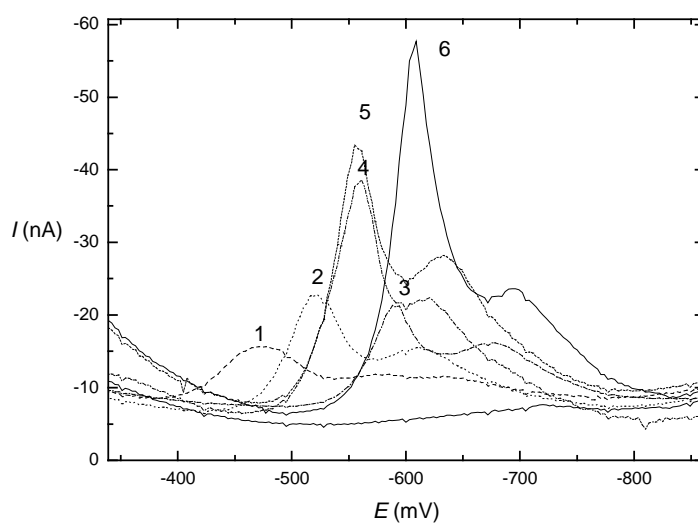
Zjištěné závislosti potenciálu píků E_p a proudu píků I_p na pH^f roztoku jsou uvedeny v tab. 6. Zaznamenané voltametrické křivky jsou na obr. 20. Závislosti potenciálu píku E_p a proudu píku I_p na pH jsou zobrazeny na obr. 21 a 22. Jako optimální bylo zvoleno pH BR pufru 12,0.

Tab. 6

Vliv pH na DP voltamogramy 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o příslušném pH (7:3).

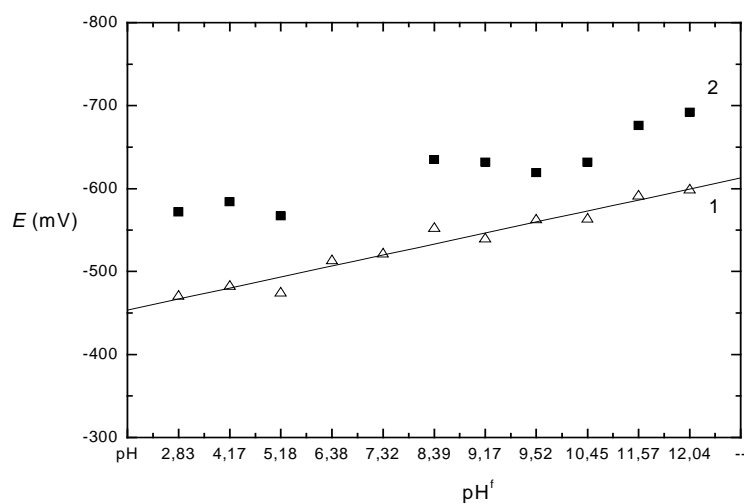
pH^f	pH	$E_{p1} [\text{mV}]$	$E_{p2} [\text{mV}]$	$I_{p1} [\text{nA}]$	$I_{p2} [\text{nA}]$
2,8	2,0	-470	-572	-23,25	-9,236
4,2	3,0	-482	-584	-28,34	-12,74
5,2	4,0	-474	-567	-13,06	-12,1
6,4	5,0	-513	- ^a	-56,69	- ^a
7,3	6,0	-521	- ^a	-54,14	- ^a
8,4	7,0	-552	-635	-101,9	-39,17
9,2	8,0	-539	-632	-31,85	-25,16
9,5	9,0	-562	-619	-92,36	-48,41
10,5	10,0	-563	-632	-91,08	-41,08
11,6	11,0	-591	-676	-41,4	-27,07
12,1	12,0	-598	-692	-47,13	-26,43

^a – pík nebyl za daných podmínek pozorován



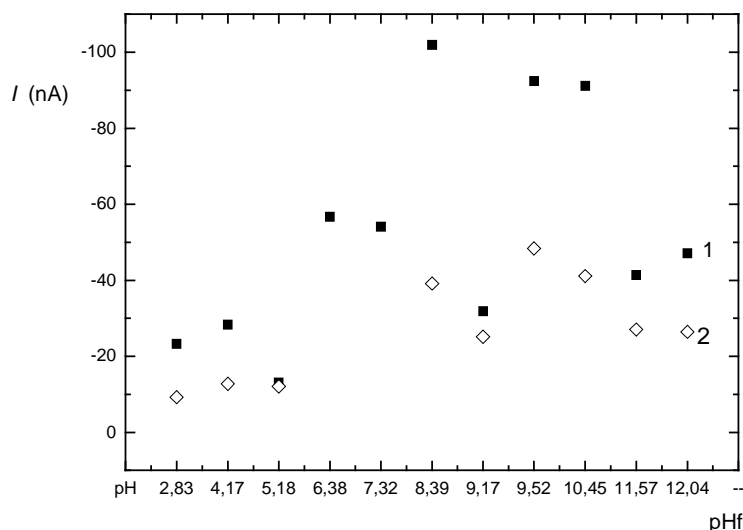
Obr. 20

Voltamogramy 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufru (7:3), pH BR pufru: 3,0 (1); 5,0 (2); 7,0 (3); 9,0 (4); 11,0 (5); 12,0 (6).



Obr. 21

Závislost potenciálu píku E_p 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^f roztoku, měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr (7:3). 1 – první pík; 2 – druhý pík.



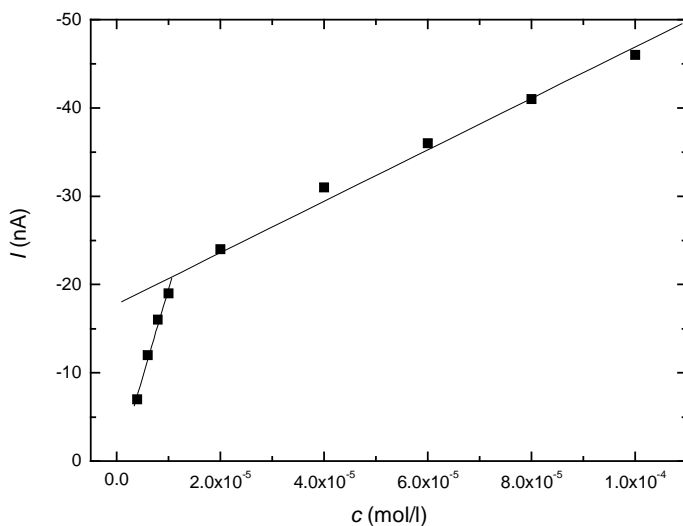
Obr. 22

Závislost proudu píku I_p 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^f roztoku, měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr (7:3). 1 – první pík; 2 – druhý pík;

3.4.2 Koncentrační závislost

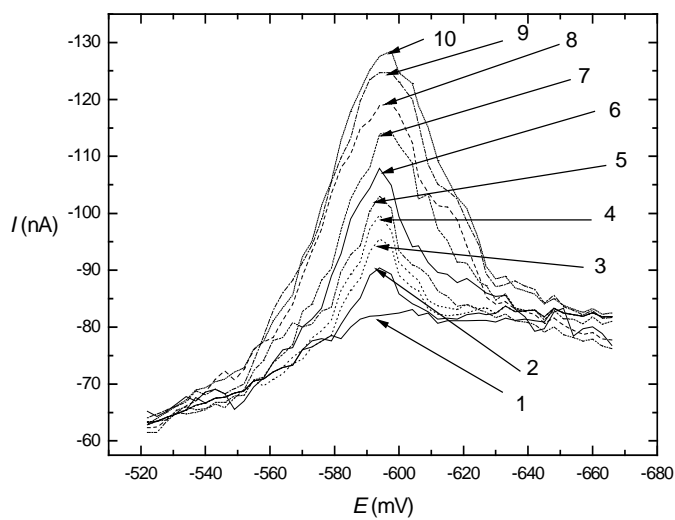
Koncentrační závislosti pro 1-NP byly měřeny metodou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 12,0 v koncentračním rozmezí $(1-10)^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, $(1-10)^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$, v objemu vzorku 120 μl . Parametry kalibrace jsou uvedeny v tab. 7. Závislost proudu píku na koncentraci 1-NP je na obr. 23. DP voltamogramy 1-NP o koncentraci $(4 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}) \text{ mol.l}^{-1}$ měřené v prostředí BR pufru o pH 12,0 jsou na obr. 24. Pro srovnání byla změřena kalibrační závislost v nádobce o objemu vzorku 12 ml stejným postupem jako v objemu vzorku 120 μl (Obr. 25 a 26) Parametry koncentračních závislostí jsou uvedeny v tabulce 7 a 8. Vzhledem k tomu, že nutnost rozdělit koncentrační závislost na dva lineární úseky se projevila v objemu 120 μl i v objemu 12 ml (u metody DCV i zde u metody DPV), je patrné, že příčinou tohoto jevu je odezva elektrody, nikoli objem vzorku

Určení opakovatelnosti výšky píků při použitém režimu bylo provedeno opakovaným změřením DP voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci ($c = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) a to jak pro stanovení v objemu 120 μl tak pro objem 12 ml. Pro stanovení v objemu 120 μl je výška I_p rovna $(-15,33 \pm 0,51) \text{ nA}$, hodnota RSD = 3,32%. Pro stanovení v objemu 12 ml je výška I_p rovna $(-7,00 \pm 0,25) \text{ nA}$, hodnota RSD = 3,6%.



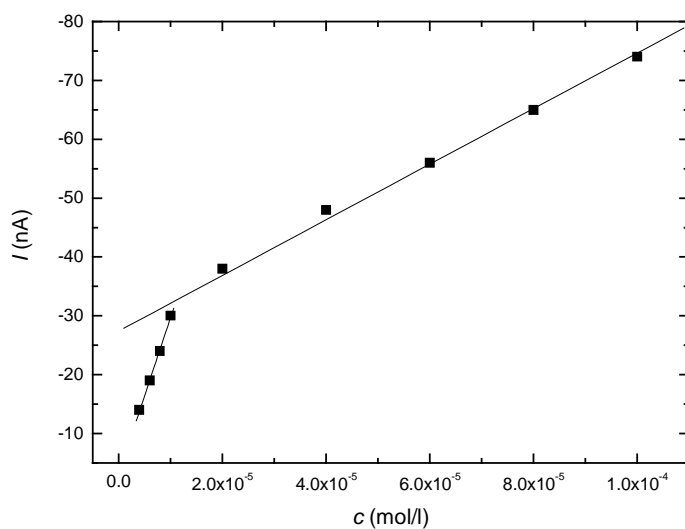
Obr. 23

Závislost proudu píku I_p na koncentraci 1-NP v rozmezí $(4 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}) \text{ mol.l}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol - BR-pufr (7:3) o pH 12,0 v objemu 120 μl .



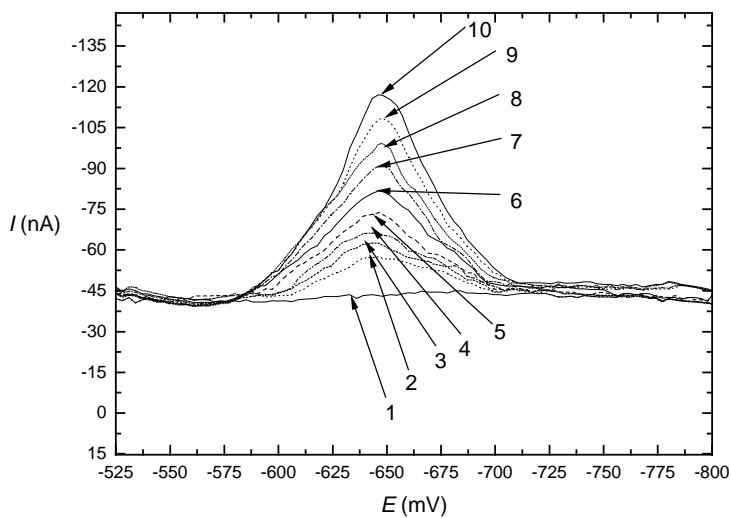
Obr. 24

Voltamogramy 1-NP měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR-pufr o pH 12,0 (7:3) v objemu 120 μl . $c(1\text{-NP}) [\text{mol.l}^{-1}]$: 0 (1); $4 \cdot 10^{-6}$ (2); $6 \cdot 10^{-6}$ (3); $8 \cdot 10^{-6}$ (4); $1 \cdot 10^{-5}$ (5); $2 \cdot 10^{-5}$ (6); $4 \cdot 10^{-5}$ (7); $6 \cdot 10^{-5}$ (8); $8 \cdot 10^{-5}$ (9); $10 \cdot 10^{-5}$ (10)



Obr. 25

Závislost proudu píku I_p na koncentraci 1-NP v rozmezí $(4 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4})$ mol.l⁻¹. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR-pufr (7:3) o pH 12,0 v objemu 12 ml.



Obr. 26

Voltamogramy 1-NP měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR-pufr (7:3) o pH 12,0 v objemu 12 ml. C (1-NP) [mol.l⁻¹]: 0 (1); $4 \cdot 10^{-6}$ (2); $6 \cdot 10^{-6}$ (3); $8 \cdot 10^{-6}$ (4); $1 \cdot 10^{-5}$ (5); $2 \cdot 10^{-5}$ (6); $4 \cdot 10^{-5}$ (7); $6 \cdot 10^{-5}$ (8); $8 \cdot 10^{-5}$ (9); $1 \cdot 10^{-4}$ (10).

Tab. 7

Parametry kalibračních závislostí 1-NP v rozmezí $(1-10) \cdot 10^{-5}$, $(4-10) \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹.
Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 12,0 v objemu 120 µl.

Koncentrace [mol.l ⁻¹]	Úsek [nA]	Směrnice [nA.l.mol ⁻¹]	Korelační koeficient	LOQ [mol.l ⁻¹]
$(1-10) \cdot 10^{-5}$	-13,398	$-5,522 \cdot 10^8$	0,9970	-
$(4-10) \cdot 10^{-6}$	0,5	$-2,32 \cdot 10^6$	0,9938	$3,95 \cdot 10^{-6}$

Tab. 8

Parametry kalibračních závislostí 1-NP v rozmezí $(1-10) \cdot 10^{-5}$, $(4-10) \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹.
Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 12,0 v objemu 12 ml.

Koncentrace [mol.l ⁻¹]	Úsek [nA]	Směrnice [nA.l.mol ⁻¹]	Korelační koeficient	LOQ [mol.l ⁻¹]
$(1-10) \cdot 10^{-5}$	-27,44	$-4,72 \cdot 10^5$	0,9966	-
$(4-10) \cdot 10^{-6}$	- 3,2	$-4,65 \cdot 10^6$	0,9989	$3,35 \cdot 10^{-6}$

4. Závěr

Byla navržena a zkonstruována miniaturizovaná měřicí nádobka umožňující měření v objemu 120 μl . Pro stanovení vybraných redukovatelných analytů byla ověřena možnost odstranění kyslíkem přídavkem siřičitanu sodného do analyzovaných roztoků přímo v měrné nádobce. Použití běžného způsobu, totiž vybublávání dusíkem, se ukázalo jako nevhodné vzhledem k tomu, že dochází k rychlému těkání organické fáze z nádoby.

Nádobka byla použita pro při stanovení modelového analytu 1-nitropyrenu 1-NP metodou DCV a DPV. Při optimalizaci těchto stanovení byl studován vliv pH na voltamogramy, což ukázalo, že nejvhodnějším elektrolytem je prostředí methanolu a BR pufru o pH 12,0 v poměru 7:3. Dosažené meze stanovitelnosti LOQ jsou $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ pro obě metody.,

1-NP v této práci sloužil pouze jako modelový analyt, použití konstrukčního řešení navrhovaného v této práci má směřovat do oblasti analýz vzorků v nižších objemech řádu 100 μl , jakož by mělo poskytnout základ pro další miniaturizaci voltametrických měřicích systémů.

Použitá literatura

1. J. Kielhorn, U. Wahnschaffe a I. Mangelsdorf., *Selected nitro- and nitro-oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons*. 2003.
2. Scheepers et al., *Exposure to dust and particle-associated 1-nitropyrene of drivers of diesel-powered equipment in underground mining*. Annals of Occupational Hygiene, 2003. **47**(5): p. 379-388.
3. Chae, Y.H., et al., *Comparative metabolism of 1-, 2-, and 4-nitropyrene by human hepatic and pulmonary microsomes*. Cancer Research, 1999. **59**(7): p. 1473-1480.
4. Moller, L., *In Vivo Metabolism and Genotoxic Effects of Nitrated Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons*. Environmental Health Perspectives, 1994. **102**: p. 139-146.
5. Karel Štulík, Christian Amatore, Karel Holub, Vladimír Mareček, Włodzimierz Kuntzer, *Microelectrodes. Definitions, characterization and application*. Pure Appl. Chem., 2000. **72**(8): p. 1483–1492.
6. Matysik, Frank Michael, *Miniaturization of electroanalytical systems*. Anal Bioanal Chem, 2002. **2003**(357): p. 33–35.
7. Olga Ordeig, et al., *Electroanalysis Utilizing Amperometric Microdisk Electrode Arrays*. Electroanalysis, 2007. **19**: p. 1973 – 1986.
8. Juskova P. , OstanaV., Palecek E. , Foret F. , *Fabrication and Characterization of Solid Mercury Amalgam Electrodes for Protein Analysis*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(7): p. 2690-2695
9. A. Ciucu, R.P.Baldwin., *Electrochemical Detection in Capillary Electrophoresis* Electrochemistry, 2002. **2002**.
10. Wang, J., *Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review*. Talanta, 2001. **56**: p. 9.
11. Pecková, K., et al., *Miniaturizované ampérometrické detektory pro HPLC a kapilární zonovou elektroforezu*. Chem. Listy, 2006(100): p. 124–132.
12. Uchiyama, Nakajima, and T. Hobo, *Detection methods for microchip separations*. Anal Bioanal Chem, 2004. **2004**(379): p. 375–382.
13. Lacher N.A., et al., *Microchip capillary electrophoresis/ electrochemistry*. Electrophoresis 2001. **2001**(22): p. 2526–2536.
14. Wang, J., *Electrochemical Detection for Capillary Electrophoresis Microchips: A Review*. Electroanalysis, 2004. **17**(13): p. 8.
15. Batz, Nicholas .G., Martin, R. Scott *Selective detection of endogenous thiols using microchip-based flow analysis and mercury/gold amalgam microelectrodes*. analyst, 2009. **134**(2): p. 372-379
16. Niaz, A., Fischer, Barek, Yosypchuk, Sirajuddin Iqbal et al., *Voltammetric Determination of 4-Nitrophenol Using a Novel Type of Silver Amalgam Paste Electrode*. Electroanalysis, 2009. **21**(16): p. 1786-1791
17. Barek, Zima., J.; Moriera, Muck, ; *Polarographic and voltammetric determination of 1-nitropyrene*. Collect. Czech. Chem. Commun, 2000. **65**(2000).
18. Vohlídal J., Štulík, *Chemické a analytické tabulky*. 1999.
19. Toriba, A., et al., *Identification and quantification of 1-nitropyrene metabolites in human urine as a proposed biomarker for exposure to diesel exhaust*. Chemical Research in Toxicology, 2007. **20**(7): p. 999-1007.

20. Spitzer, B., et al., *Determination of 1-nitropyrene in herbs after selective enrichment by a sol-gel-generated immunoaffinity column*. Journal of Chromatography A, 2000. **880**(1-2): p. 113-120.
21. Young-Heum Chae, F. Peter Guengerich, Peter P. Fu, and Karam El-Bayoumy², *Comparative Metabolism of 1-, 2-, and 4-Nitropyrene by Human Hepatic and Pulmonary Microsomes*. Cancer research, 1999. **59**(59): p. 7.
22. Akira Toriba, Russell L. Dills, Satoko Mizukami, Kaori Tanabe, Naoki Takeuchi, Takayuki Kameda, Ning Tang, Kazuichi Hayakawa, Simpson; *Identification and Quantification of 1-Nitropyrene Metabolites in Human Urine as a Proposed Biomarker for Exposure to Diesel Exhaust*. Chem. Res. Toxicol, 2007. **Vol. 20**(No. 7): p. 9.
23. Hayakawa, K., et al., *Determination of 1-nitropyrene metabolites by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection*. Journal of Chromatography A, 2006. **1107**(1-2): p. 286-289.
24. Prycek, J., M. Ciganek, and Z. Simek, *Clean-up of extracts for nitrated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons analyses prior to their gas chromatography determination*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2007. **18**(6): p. 1125-1131.
25. Lintelmann, J., et al. *Determination of oxygenated, nitrated and native Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Aerosols using different, liquid chromatographic based methods*. in *European Aerosol Conference 2007*. 2007. Salzburg.
26. Barek, J., et al., *Polarographic and voltammetric determination of 1-nitropyrene*. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 2000. **65**(12): p. 1888-1896.
27. Karasek, J., *Voltametrické stanovení 1-nitropyrenu na stříbrné tuhé amalgámové elektrodě*. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, 2008, 2008.
28. Barek, J., et al., *Study of voltammetric determination of carcinogenic 1-nitropyrene and 1-aminopyrene using a glassy carbon paste electrode*. Sensors, 2004. **4**(5): p. 47-57.
29. J. Lintelmann, M. Heil-Franca, G. Matuschek, *Determination of oxygenated, nitrated and native Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Aerosols using different, liquid chromatographic based methods*. Anal. Bioanal. Chem, 2005. **381**: p. 508-519.
30. Yosypchuk O., Karolina P., Barek J., *Voltammetric Determination of 1-Nitropyrene and 1-Aminopyrene at a Boron-Doped Diamond Film Electrode*. Chem. Listy, 2010. **104**(3): p. 186-190
31. Stoppacher N., Pittner F., Sontag G., *Design of a voltammetric immunosensor for determination of 1-nitropyrene*. Monatshefte fur chemie, 2010. **140**(8): p. 909-914
32. Yosypchuk, B., J. Barek, *Analytical Applications of Solid and Paste Amalgam Electrodes*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2009(39): p. 189-203.
33. Yosypchuk, B., J. Barek, and M. Fojta, *Carbon powder based films on traditional solid electrodes as an alternative to disposable electrodes*. Electroanalysis, 2006. **18**(11): p. 1126-1130.
34. Karolina Pecková, Jiri Barek, Greg M. Swain, *Boron Doped Diamond Microelectrodes and Microelectrode Arrays in Organic Electrochemistry*. 2010.